
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LES SUBSTANCES BACTÉRIOLYTIQUES
DES LEUCOCYTES
ET LEURS RAPPORTS AVEC L'ALEXINE (1)

par le Dr GENGOU

(Institut Pasteur de Bruxelles).

La découverte de la phagocytose et de la destruction de certaines bactéries à l'intérieur des globules blancs a suscité, depuis les travaux de Metchnikoff, de nombreuses recherches sur la nature et les propriétés des substances actives des leucocytes.

La plupart de ces travaux ont eu, en outre, pour objet d'établir les rapports existant entre ces substances et l'alexine (2).

On s'est efforcé, en soumettant les globules blancs à divers traitements (macération à différentes températures et dans divers liquides, congélation, broyage avec des substances inertes, etc.), de retirer les matières auxquelles ils doivent leur pouvoir de détruire dans leur protoplasma les bactéries ingérées.

(1) Les expériences décrites dans cette note ont été faites en 1915 et n'ont pu être publiées jusqu'ici. La plupart de leurs résultats ont été signalés par Bordet : *L'immunité dans les maladies infectieuses*, Masson, 1920.

(2) LEVADITI a analysé les travaux relatifs à ces questions dans une revue à laquelle, pour ne pas allonger cet exposé, nous renvoyons le lecteur. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1914.

On a obtenu de la sorte des extraits qui se sont montrés capables, en effet, de tuer certaines bactéries. De ce pouvoir bactéricide des extraits, on a conclu qu'ils renferment réellement les substances antimicrobiennes mêmes des leucocytes, dans l'état où elles se trouvent dans le protoplasma cellulaire.

Cette conclusion n'est pas admise, il est vrai, par tous. D'après Selter (1), les substances leucocytaires étudiées jusqu'ici ne seraient, pour Pfeiffer (2), que des produits artificiels formés lors des manipulations infligées aux leucocytes.

Sans doute cette allégation ne peut-elle être envisagée que comme une hypothèse dépourvue de preuves. Mais il faut bien reconnaître que les expérimentateurs qui ont assimilé les principes bactéricides des extraits leucocytaires étudiés par eux aux substances agissant dans l'intérieur même du globule blanc en vie, ne se sont guère préoccupés d'établir cette identité sur des bases irréfutables.

La mort d'un microbe peut être due en effet à des agents bien différents. Elle constitue donc difficilement un critérium absolu de l'identité des agents auxquels des milieux microbicides divers doivent leur pouvoir.

D'autre part, la propriété bactéricide d'une substance déterminée est habituellement démontrée par la méthode des plaques, c'est-à-dire par le dénombrement des colonies obtenues dans un milieu nutritif, tel que la gélose, ensemencé d'une émulsion microbienne soumise au préalable, pendant un temps déterminé, à l'action de la substance en expérience. C'est cette méthode qui a été utilisée jusqu'ici dans tous les travaux ayant trait à l'action bactéricide des extraits leucocytaires. Or, ceux-ci ont aussi la propriété d'agglutiner les bactéries. La diminution du nombre de colonies due à l'action d'un extrait leucocytaire, qui est toujours imputée à son pouvoir microbicide, résulte donc, en partie au moins, de l'agglutination bactérienne; on n'en tient cependant pas compte. Enfin, les bactéries qui succombent dans le protoplasme leucocytaire y subissent au préalable une transformation morphologique caractéristique : le vibron cholérique, le bacille pyocyanique, par exemple, pren-

(1) SELTER. *Zeitschr. f. Immunität.*, 1920, 30, fasc. 2, p. 419.

(2) FRIEDBERGER et PFEIFFER. *Lehrbuch der Mikrobiologie*, Iena, 1919, p. 489.

ment, avant de disparaître, la forme de granules, dont les propriétés vis-à-vis des couleurs se modifient au fur et à mesure que se prolonge leur séjour intracellulaire. Or, cette transformation caractéristique n'a jamais été signalée dans l'action des extraits leucocytaires sur les espèces bactériennes qui la montrent, quand elles se trouvent à l'intérieur des globules blancs.

Ces remarques nous ont incité à chercher une méthode de traitement des globules blancs, fournissant des extraits susceptibles d'imprimer cette transformation aux bactéries. Un extrait jouissant de cette propriété pourrait évidemment être considéré comme renfermant les substances leucocytaires, dans l'état qu'elles possèdent dans le phagocyte. Il permettrait en outre d'en étudier les propriétés, sans recourir à la mesure de son pouvoir bactéricide par la méthode des plaques (1).

Il permettrait enfin une comparaison, plus sûre que celle qu'on a pu faire jusqu'ici, des principes bactériolytiques des leucocytes et de l'alexine.

En effet, la transformation intraleucocytaire des microbes en granules est identique, dans son aspect, à celle que subissent certaines espèces bactériennes sous l'influence de l'alexine. Ce fait constitue même l'un des arguments invoqués par certains auteurs, pour conclure à l'analogie de l'alexine et des substances bactéricides des globules blancs.

Or, la plupart des expérimentateurs qui ont analysé les propriétés des extraits leucocytaires se sont aussi attachés à l'étude de l'identité de l'alexine et des substances leucocytaires. La plupart d'entre eux ont conclu qu'il s'agit d'éléments différents.

Cette conclusion prête le flanc à la critique, car, pour comparer les propriétés de l'alexine à celles des substances bactéricides des leucocytes, il importe évidemment d'utiliser des extraits cellulaires capables, comme les leucocytes eux-mêmes, de transformer des bactéries en granules. Or, ainsi que nous venons de le dire, cette condition n'a pas été remplie jusqu'ici.

(1) TURRO vient d'obtenir, comme nous en 1915, mais par une méthode différente de la nôtre, des extraits cellulaires transformant également le vibron cholérique en granule. *Soc. de Biol.*, 1921.

* * *

On peut extraire les substances bactériolytiques des globules blancs, en traitant ceux-ci par un acide dilué, puis en neutralisant exactement le liquide obtenu, débarrassé au préalable des cellules.

EXPÉRIENCE. — Ayant prélevé et citraté l'exsudat obtenu par injection intrapleurale de bouillon à un lapin, on en soumet les leucocytes à des lavages répétés au liquide de Ringer, puis on les délaie dans un volume tel de ce liquide que l'émulsion (A) renferme environ 40.000 leucocytes par millimètre cube.

Après nouvelle centrifugation, le sédiment de leucocytes est délayé dans un volume d'acide chlorhydrique centinormal, égal à 2-2,5 fois le volume de l'émulsion A. Le mélange est mis à une température de 6-8°, pendant une heure au minimum, puis centrifugé.

On neutralise le liquide aussi exactement que possible par une solution centinormale de soude. Cette neutralisation provoque la formation lente d'un précipité, dont on se débarrasse par centrifugation. Le liquide surnageant constitue l'extrait leucocytaire.

Ce liquide, à peine opalescent, possède la propriété de transformer en granules le vibron cholérique. On introduit dans une série de tubes des volumes croissants d'extrait (0 c. c. 1 à 0 c. c. 6); on ramène, dans chacun, le volume à 0 c. c. 6 par addition d'eau physiologique; puis on additionne chaque tube de 0 c. c. 1 d'une émulsion cholérique (une culture de dix-huit heures sur gélose délayée dans 20 à 30 cent. cubes d'eau physiologique). Après un séjour d'une heure à 37°, la transformation des vibrions en granules est complète dans les tubes contenant 0 c. c. 3 à 0 c. c. 6 d'extrait, de moins en moins marquée au fur et à mesure que la dose d'extrait est plus faible.

Nous nous sommes habituellement servi, pour faire nos extraits, d'acide chlorhydrique. Cependant nous avons obtenu des résultats positifs en employant des solutions d'acide lactique en concentration de 1 p. 1.000 à 1 p. 100.

Il se pourrait donc que la nature de l'acide employé fût, dans une certaine mesure, indifférente.

L'acide doit rester au moins une heure au contact des globules blancs; mais son action peut être prolongée sans inconvénient pendant vingt-quatre ou quarante-huit heures. Nous avons même souvent conservé pendant des semaines en milieu acide, tout comme en milieu neutre, nos extraits leucocytaires.

Par contre, il n'est pas indifférent de faire agir l'acide dilué sur les cellules à n'importe quelle température : tandis que nos

recherches ont été régulièrement positives en opérant entre 5 et 20°, les extraits obtenus entre 23 et 37° se sont montrés d'autant moins actifs que la température d'extraction était plus élevée.

En observant cette technique, nous avons pu extraire les substances actives même aux dépens de leucocytes séchés et conservés plusieurs jours dans cet état.

Par contre, les leucocytes chauffés à 55° pendant trente minutes, ou traités par l'alcool sans dessiccation préalable, ne nous ont donné que des extraits inactifs.

Nous avons obtenu des résultats analogues en nous servant de leucocytes de cobaye. Toutefois, il faut recourir dans ce cas à une solution décinormale (d'acide chlorhydrique, par exemple).

Ajoutons que nous n'avons jamais pu obtenir d'extraits actifs aux dépens de globules rouges, de plaquettes sanguines ou de cellules spléniques. De même, les résultats ne sont positifs que si l'on emploie des exsudats jeunes constitués de leucocytes polynucléaires. Lorsqu'on retire les exsudats de la cavité pleurale du lapin plusieurs jours après leur production, ils renferment une proportion de plus en plus considérable de mononucléaires. Ces exsudats ne nous ont jamais donné d'extrait capable de transformer en granules les bactéries, qui subissent cette modification morphologique à l'intérieur des leucocytes à noyau polymorphe.

Si on soumet des quantités identiques de leucocytes polynucléaires de lapin soit à l'action d'un acide dilué, comme dans l'expérience relatée ci-dessus, soit à la congélation, ou à la macération à diverses températures dans de l'eau physiologique, on n'obtient d'extrait capable d'imprimer au vibrion cholérique la transformation signalée par Metchnikoff que par l'intervention d'un milieu acide.

On pourrait émettre l'hypothèse que les procédés d'extraction qui ne fournissent pas de liquide actif retirent néanmoins les substances leucocytaires, mais dans un état latent, et que l'intervention d'un acide est nécessaire à leur activation. On peut démontrer qu'il n'en est rien. Si on ajoute à un extrait obtenu par la macération de leucocytes dans l'eau physiologique à 37° ou à 55°, ou par la congélation, une quantité d'acide chlorhydrique suffisante pour obtenir dans le liquide une solu-

tion centinormale d'acide, l'extrait, neutralisé après une ou plusieurs heures, se montre absolument incapable de transformer en granule le vibron cholérique. Il en est encore ainsi, si l'on obtient l'extrait leucocytaire par la méthode de Fiessinger ou celle de Jochmann.

On peut dès lors, semble-t-il, admettre que, dans le procédé d'extraction que nous avons employé, l'acide n'a pas pour effet de rendre actives des substances qui, tout en étant parfaitement dissoutes dans l'intérieur du leucocyte, s'y trouveraient cependant dans un état préparatoire inactif. Il semble, au contraire, avoir pour rôle de dissoudre les substances actives des globules blancs, qui, à l'état de repos, se trouveraient insolubilisées dans le protoplasma cellulaire.

Cependant, si l'acide paraît nécessaire à la dissolution des substances leucocytaires qui ont fait l'objet de nos recherches, il ne s'ensuit pas que sa présence soit également nécessaire lors de l'action même de ces substances sur les éléments microbiens. Pour que cette action se produise, il faut que le milieu soit exactement neutralisé, ou tout au moins que la concentration en acide ou en alcali ne dépasse pas celle d'une solution à 1/300^e normale d'acide chlorhydrique ou de soude.

Cette inactivité de l'extrait leucocytaire en milieu acide est due à ce que, comme le montre l'expérience, ses principes actifs, dans ces conditions, ne se fixent pas aux microbes, alors qu'ils sont adsorbés par les mêmes bactéries en milieu neutre.

Ce fait doit être mis en parallèle avec l'action empêchante que la réaction acide exerce sur d'autres phénomènes d'adhésion que peuvent présenter les substances actives des extraits leucocytaires. Ces substances sont adsorbées, en effet, très avidement par le tissu des dialyseurs, tels que ceux de Schleicher et Schühl. Mais cette adsorption ne se produit pas, si le contact de l'extrait et du tissu dialyseur a lieu en milieu acide.

Tout se passe donc comme si le premier acte de l'action des substances actives des leucocytes sur les microbes pouvait être comparé à un phénomène d'adsorption.

Donc, le rôle de l'acide, dans le phénomène qui aboutit à la transformation du vibron cholérique en granule, paraît être de dissoudre les substances actives des leucocytes. Ensuite, pour que celles-ci puissent se fixer sur les bactéries, condition

préalable à leur action sur ces dernières, il faut qu'elles soient ramenées, par la neutralisation du milieu, à un état colloïdal plus instable et, conséquemment, plus favorable à l'adhérence.

Peut-être n'est-il pas illogique d'émettre l'hypothèse que, dans l'intérieur du leucocyte, les faits se succèdent dans le même ordre. Lors de la digestion intracellulaire de germes ingérés par un leucocyte, la vacuole digestive présente d'abord une réaction acide, qui disparaît ultérieurement. Peut-être cette réaction acide a-t-elle pour effet de provoquer la dissolution des substances actives des leucocytes, la neutralisation ultérieure de cette réaction ayant pour conséquence de permettre l'action de ces substances sur les bactéries phagocytées, en les ramenant à un état colloïdal favorable à leur fixation sur les corps microbiens.

* * *

Propriétés des extraits leucocytaires obtenus par les acides.

1^o Ces extraits transforment en granules le vibron cholérique, le vibrio metchnikovii, le bacille pyocyanique, le bacille typhique, le paratyphus A et, dans une mesure moins marquée, le bactérium coli.

Cette diversité de germes sensibles aux extraits leucocytaires permet de présumer que l'action de ceux-ci n'est pas due à des substances diverses, chacune d'elles s'adressant spécifiquement à une espèce microbienne déterminée. En effet, si l'on ajoute à une quantité déterminée d'extrait (2 c. c. 4), un excès de bactéries typhiques ou de bactéries charbonneuses (par exemple, 1 c. c. 5 d'une culture de 24 heures sur gélose, délayée dans 5. c. c. d'eau physiologique), on épouse l'extrait de toute activité, aussi bien vis-à-vis du vibron cholérique, du vibron metchnikovii, etc., que du bacille typhique. Il s'agit donc vraisemblablement de substances pouvant porter indifféremment leur action sur des espèces microbiennes diverses.

2^o Cette action est entravée par le sérum sanguin inactivé ou par le liquide d'ascite; c'est, par exemple, le cas si on ajoute à 0 c. c. 3 d'extrait 0 c. c. 5 de sérum inactivé de lapin.

3^o La marge de la température à laquelle la transformation des vibrions en granules peut se faire est extrêmement large.

Elle ne se produit pas à basse température, mais on l'obtient aisément à 25°, mieux encore à 37°; elle est encore très nette à 60°, même quand l'extrait est additionné d'une quantité de sérum inactivé, insuffisante pour empêcher son action.

4° Les substances actives des extraits leucocytaires se conservent remarquablement soit en milieu neutre, soit en milieu acide.

5° D'autre part, elles résistent également très bien à l'action de la chaleur.

En effet, en milieu neutre, elles ne sont qu'affaiblies par un chauffage de 30 minutes à 80°, et elles ne sont inactivées que par un chauffage à 100° pendant 15 minutes.

En milieu acide ($\frac{N}{200}$ à $\frac{N}{500}$), elles ne sont pas inactivées, même par un chauffage de 15 minutes à 100°; car, si on neutralise l'extrait après refroidissement, le vibron cholérique s'y transforme encore parfaitement en granule. En milieu légèrement alcalin, les substances leucocytaires sont inactivées par un chauffage à 80° pendant 30 minutes.

6° Il ne faudrait pas conclure de la résistance des extraits leucocytaires à la chaleur, surtout en milieu acide, que leurs substances actives ne sont pas de nature protéique. En effet, quand l'extrait chauffé reste actif, on peut y déceler aisément des matières albuminoïdes précipitables.

Rien ne nous autorise donc à l'heure présente, à prétendre que les matières actives des leucocytes ne sont pas des substances protéiques. Aucune méthode ne nous a permis jusqu'ici de les en séparer. C'est ainsi que si on traite un extrait après dessiccation, par l'alcool, l'acétone, l'éther ou un mélange de ces corps, le liquide n'en retire aucun principe actif, et la dissolution ultérieure des éléments de l'extrait qui sont restés insolubles au contact de ces solvants se montre parfaitement capable d'agir sur les vibrons. D'autre part, les substances leucocytaires actives ne dialysent pas en présence d'eau physiologique (1).

(1) On prend, bien entendu, pour faire cette recherche, la précaution d'acidifier l'extrait, de même que l'eau physiologique extérieure au dialyseur (concentration $\frac{N}{100}$ HCl), attendu que (voir plus haut), en milieu neutre, les substances leucocytaires se fixent sur la membrane dialysante.

7^o Les extraits, tout en étant énergiquement bactériolytiques, se montrent complètement privés de toute action hémolytique, même vis-à-vis de globules sensibilisés. Ce fait mérite d'autant plus d'être signalé que, d'après Bordet (1), divers expérimentateurs ont noté un certain pouvoir hémolytique dans leurs extraits. Cette propriété surprend d'autant plus que, ainsi qu'on le sait depuis longtemps, les hématies englobées par un leucocyte n'y subissent pas rapidement de transformations comparables à celles qui constituent le phénomène de l'hémolyse.

Nous nous sommes assuré que l'absence de pouvoir hémolytique dans nos extraits n'est pas due à l'absence de l'un ou l'autre des deux fragments (chaînon intermédiaire, chaînon terminal), que l'on distingue dans l'alexine. En effet, ni l'addition de chaînon intermédiaire, ni l'addition de chaînon terminal ne confère de pouvoir hémolytique à l'extrait. On doit donc admettre, que, ne pouvant être complété ni par l'un ni par l'autre, il ne contient ni l'un ni l'autre.

D'ailleurs, il ne donne pas lieu davantage au phénomène de la conglutination de Bordet et Streng (2), qui s'observe, comme on le sait, quand on ajoute du sérum inactivé de bœuf à des éléments microbiens ou hématiques, sensibilisés et chargés d'alexine.

8^o Il convient toutefois de remarquer que, si les substances actives des extraits leucocytaires ne sont pas hémolytiques, elles sont cependant mieux absorbées par les globules rouges sensibilisés, que par des globules rouges normaux de même espèce.

De même, elles sont absorbées par les précipités spécifiques. C'est ce que montre l'expérience suivante :

On introduit dans 3 tubes (I, II, III) respectivement 1 c. c. 5 de globules lavés de chèvre, non sensibilisés, 1 c. c. 5 de globules sensibilisés et, après lavage, le précipité spécifique obtenu par mélange de 0 c. c. 25 de sérum de bœuf inactivé et dilué au 1/10^e et de 0 c. c. 75 de sérum lapin, antibœuf. Après centrifugation, on ajoute à chaque sédiment 2 c. c. d'extrait leucocytaire. Après une action de dix heures, à la température ordinaire, on centrifuge et on met les liquides décantés en contact avec des sédiments respectivement identiques aux précédents. On centrifuge après un nouveau contact de dix heures.

On prépare en même temps 2 tubes témoins, contenant chacun 2 cent. cubes d'extrait, on ajoute à l'un (IV) un volume d'eau physiologique égal au volume

(1) BORDET. *Loc. cit.*

(2) BORDET et STRENG. *Centralbl. f. Bakter.*, 49, 1909.

du sédiment I et II, à l'autre (V), une quantité d'eau physiologique égale au volume du sédiment du tube III.

A 0 c. c. 6 de chacun des liquides I à V, on ajoute 0 c. c. 1 d'une émulsion de choléra ; après une heure, la transformation du vibrion est complète dans les tubes IV et V, nulle dans les tubes II et III, fort prononcée, mais incomplète, dans le tube I.

9^o Nous avons constaté que les substances leucocytaires extraites par l'acide n'augmentent pas en quantité ou en activité au cours de la vaccination. Nous avons étudié à cet égard, parallèlement aux exsudats de lapins neufs, les exsudats fournis par des lapins solidement vaccinés contre le vibrion cholérique ou le bacille pyocyanique, ainsi que les exsudats provoqués au cours même de la vaccination, à divers intervalles des injections vaccinantes. Nous n'avons pas davantage constaté de modification appréciable dans des exsudats obtenus, soit chez des animaux neufs, soit chez des animaux vaccinés, non plus par simple injection intrapleurale de bouillon Martin, mais par injection de bouillon additionné d'une quantité importante de bactéries.

Ces expériences confirment les constatations faites antérieurement au sujet du pouvoir bactéricide des extraits leucocytaires par Schneider, Selter (1) ; les substances bactériolytiques des leucocytes se comportent à cet égard comme d'autres principes de l'organisme, tels que l'alexine.

10^o Ajoutons enfin que nos extraits leucocytaires ne transforment pas un plus grand nombre de bactéries, lorsque celles-ci ont été sensibilisées au préalable par le sérum spécifique homologue, qu'il s'agisse de vibrions cholériques, ou de bacilles typhiques etc., ainsi que le montre l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE. — On délaie dans 25 cent. cubes d'eau physiologique une culture de choléra sur gélose (émulsion I non sensibilisée). On traite 2 c. c. 5 de cette émulsion par 7 c. c. 5 de sérum anticholérique inactivé. Après deux heures, on débarrasse les microbes du sérum et on les remet en suspension dans 2 c. c. 5 d'eau physiologique (émulsion II sensibilisée).

On s'assure que l'émulsion II est réellement sensibilisée, en en mélangeant 0 c. c. 2 à 0 c. c. 05 de sérum frais de lapin, le tout étant additionné de 0 c. c. 6 d'eau physiologique. Après un séjour de quarante-cinq minutes à 37°, la transformation des vibrions est complète, tandis qu'elle est nulle dans un tube semblable, contenant, au lieu de vibrions de l'émulsion II, 0 c. c. 2 de l'émulsion I.

(1) D'après SELTER. *Loc. cit.*

On introduit ensuite, dans les tubes 1 à 5, 0 c. c. 1 de l'émulsion I, dans les tubes 6 à 10, 0 c. c. 1 de l'émulsion II; on ajoute à chacun des 5 premiers des doses décroissantes d'extrait (0 c. c. 5 à 0 c. c. 1), les mêmes quantités étant introduites dans les tubes correspondants de la série 6 à 10. Le volume total est porté partout à 0 c. c. 6 par addition d'eau physiologique. Après un séjour d'une heure à 37°, la transformation des vibrios en granules est exactement la même, dans les tubes correspondants des deux séries; elle est complète dans les deux tubes contenant 0 c. c. 5 d'extrait, partielle en présence de 0 c. c. 3 et nulle dans les tubes ne renfermant que 0 c. c. 1 d'extrait.

Il était d'autant plus indiqué de faire cette recherche, que certains auteurs ont prétendu avoir réactivé des immunsérum s chauffés à 55° par addition d'extraits leucocytaires, alors que d'autres n'ont eu à cet égard que des résultats négatifs (1).

* * *

Parmi les propriétés des substances leucocytaires obtenues en milieu acide, il en est un certain nombre que divers auteurs ont observées dans les extraits bactéricides dus à d'autres méthodes. Ils ont constaté, notamment, la résistance relative des substances bactéricides de leurs extraits à la chaleur, au vieillissement; ils ont observé leur insolubilité dans l'alcool, l'acétone, l'éther, etc., et ont noté l'action empêchante du sérum.

C'est en se basant sur ces différences entre les propriétés de leurs extraits et celles de l'alexine, qu'ils ont conclu à l'absence de relation entre celles-ci et les substances bactériolytiques leucocytaires.

Nous avons dit plus haut que cette conclusion prêtait le flanc à la critique; les extraits leucocytaires obtenus jusqu'ici n'ont jamais reproduit, en effet, la transformation caractéristique subie par certains microbes, comme le vibron cholérique, dans l'intérieur du phagocyte. Les expériences auxquelles ils ont servi ne peuvent donc être opposées à l'argument tiré de l'analogie de cette transformation et de la modification subie par les microbes sous l'influence de l'alexine, en faveur de l'identité de celle-ci et des substances bactériolytiques leucocytaires.

(1) D'après LEVADITI. *Loc. cit.*

La méthode d'extraction par les acides nous fournit, au contraire, des liquides capables de transformer en granules les espèces bactériennes susceptibles de subir cette transformation à l'intérieur des leucocytes. Elle donne donc les éléments nécessaires pour discuter la valeur de cet argument. Or, les propriétés des substances leucocytaires obtenues par ce procédé sont bien différentes des caractères de l'alexine. L'argument invoqué en faveur de l'identité de celle-ci et de ces substances, que nous venons de rappeler, n'est donc pas fondé.

a) En effet, tout en étant aptes à transformer en granule le vibrios cholérique et d'autres bactéries, les extraits leucocytaires sont dépourvus de tout pouvoir hémolytique et n'en acquièrent aucun, qu'on les additionne de chaînon intermédiaire ou de chaînon terminal, vis-à-vis de globules rouges sensibilisés, susceptibles d'être dissous par l'alexine de même espèce animale.

Donc si, en ce qui concerne l'alexine, la bactériolyse est bien un phénomène analogue à l'hémolyse, il ne faut pas en conclure que toute substance susceptible de déterminer la première doive nécessairement être capable de produire la seconde.

b) Nos extraits leucocytaires ne sont pas davantage rendus hémolytiques par l'addition d'auxilysine (1) de cobaye. Ils se distinguent encore de l'alexine en ce qu'ils ne préparent pas les éléments sensibilisés à l'action ultérieure d'autres agents, par exemple la conglutinine du sérum inactivé de bœuf.

c) Leur action s'exerce encore à des températures incompatibles avec celle de l'alexine.

d) Les substances actives de ces extraits résistent à la chaleur beaucoup mieux que l'alexine. Ce fait, observé depuis longtemps par beaucoup d'auteurs pour divers extraits leucocytaires, mérite cependant encore d'être rappelé. Ainsi que le signale Levaditi (2), la résistance à la chaleur des substances actives des liquides de l'organisme est fort influencée par la composition du milieu où elles se trouvent.

Or les extraits leucocytaires que nous avons obtenus résistent à la chaleur, ainsi que nous avons pu nous en assurer,

(1) GENGOU. *Centralbl. f. Bakter.*, 49.

(2) *Loc. cit.*

même s'ils sont additionnés de sérum inactivé, de façon à constituer un liquide comparable à de l'alexine diluée.

e) Enfin, contrairement à ce qui se passe pour l'alexine de même espèce, les microbes impressionnés par le sérum spécifique homologue ne sont pas plus sensibles à l'influence des substances bactériolytiques des leucocytes que les microbes neufs. Ce fait nous paraît confirmer, d'une manière particulièrement démonstrative, la notion que l'alexine n'est pas identique aux substances leucocytaires, que détruisent les bactéries à l'intérieur des leucocytes.

On peut cependant nous objecter que les précipités spécifiques, comme nous l'avons signalé nous-même ci-dessus, absorbent remarquablement les substances actives des extraits leucocytaires et que, de même, les globules sensibilisés se distinguent à cet égard des globules neufs. Or la propriété d'être absorbée par les éléments sensibilisés et de ne pas l'être (ou peu) par les éléments non sensibilisés, est une propriété essentielle de l'alexine.

Il convient de remarquer, à ce sujet, que divers auteurs ont montré que le pouvoir des éléments sensibilisés de fixer à leur surface de nouveaux éléments ne s'exerce pas seulement vis-à-vis de l'alexine. Bordet et Gengou (1) ont constaté, en effet, que si on mélange en certaines proportions un antigène amorphe (sérum) et l'antisérum correspondant, puis qu'on ajoute à l'ensemble des globules rouges, ceux-ci adhèrent au précipité spécifique résultant de l'union de l'antigène et de l'anticorps et forment rapidement de gros amas.

De même, les globules rouges sensibilisés adhèrent remarquablement aux globules blancs, tandis que les hématies non sensibilisées s'y refusent (Barikine) (2). Divers faits montrent donc que le pouvoir d'adsorption des éléments sensibilisés peut s'exercer vis-à-vis d'autres éléments que l'alexine. Conséquemment, si la fixation de l'alexine sur des éléments morphologiques, tels que microbes ou globules, sous l'influence d'un sérum, constitue la preuve — ce qui reste vrai — de la présence, dans ce sérum, d'anticorps spécifiques, homologues de ces

(1) BORDET et GENGOU. *Centralbl. f. Bakter.*, 49.

(2) BARIKINE. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1910, 8.

éléments, on ne peut pas par contre conclure que toute substance se fixant mieux sur des éléments sensibilisés que sur les mêmes éléments non sensibilisés soit de l'alexine.

L'objection que l'on pourrait tirer de nos propres expériences ne paraît donc pas établie.

Tout se passe donc comme si les substances, qui, dans les leucocytes, impriment aux vibrions cholériques la même transformation que celle qu'ils subissent sous l'influence de l'alexine, étaient bien distinctes de celle-ci. Cette transformation granulaire pouvant être produite par des substances différentes, on ne peut donc conclure, sans investigation plus complète, de la production de ce phénomène sous l'influence de liquides différents, que l'action de ceux-ci est due à une seule et même substance.

Les résultats consignés ci-dessus permettent, d'autre part, de réfuter l'opinion d'après laquelle les microbes ne se transforment en granules à l'intérieur des leucocytes, que parce qu'ils se sont auparavant teintés d'alexine.

Cette allégation, d'après Selter (1), aurait encore été formulée récemment par Pfeiffer.

En effet, dans nos expériences, les bactéries ne sont, à aucun moment, en contact avec du sérum ou tout autre liquide contenant de l'alexine. Lorsqu'ils se transforment en granules, en présence des extraits leucocytaires, c'est bien à l'action des substances fournies par les globules blancs que ce phénomène est dû, et non à leur imprégnation préalable par l'alexine.

* * *

Nous avons enfin recherché si les substances des extraits leucocytaires, qui déterminent la transformation granulaire des bactéries utilisées dans nos recherches, se confondent avec les ferment protéolytiques que plusieurs auteurs ont signalés chez les globules blancs.

Nos extraits n'ont pas montré de propriété protéolytique très marquée. Toutefois, dans des conditions que nous avons précisées, ils sont régulièrement capables de dissoudre la gélatine.

(3) *Loc. cit.*, p. 119.

Pour le démontrer, nous avons mélangé à un volume constant (0 c. c. 5) de gélatine à 10 p. 100, de réaction neutre, des volumes croissants (0 c. c. 1 à 0 c. c. 5) d'extrait leucocytaire, le volume total étant toujours ramené à 1 cent. cube par addition d'eau physiologique. Après un séjour de vingt-quatre heures à 37°, le mélange est parfaitement coagulable dans le tube témoin (pas d'extrait ; 0 c. c. 5 d'eau physiologique), tandis qu'il est devenu incoagulable dans les tubes contenant 0 c. c. 3 à 0 c. c. 5 d'extrait.

Les propriétés de ce ferment gélatinolytique se confondent, à certains égards, avec celles des substances des extraits leucocytaires qui transforment les vibrios en granules. Ainsi il réclame, comme elles, une réaction neutre ; il est absorbé par les bactéries, par les précipités spécifiques et par les tissus des dialyseurs ; il n'exerce pas son action en présence de sérum.

Par contre, certains de ses caractères se distinguent des propriétés des substances bactériolytiques des leucocytes :

a) Quoique l'intervention de l'acide soit nécessaire à l'extraction du ferment gélatinolytique, elle exige cependant certaines précautions pour donner un résultat positif. Nous avons vu plus haut que, par l'action de l'acide, on obtient un extrait bactériolytique, quelle que soit la durée de l'action de l'acide, du moment que cette action s'exerce pendant une heure au moins.

Au contraire, il importe, pour observer le pouvoir gélatinolytique, de ne laisser agir l'acide sur les leucocytes que pendant une ou deux heures à la glacière. Si on prolonge cette action ou si on laisse à l'extrait sa réaction acide pendant vingt-quatre heures, l'extrait a perdu toute propriété gélatinolytique, tout en gardant intacte son action sur les bactéries.

b) La dissolution de la gélatine par l'extrait ne se manifeste plus, lorsque les mélanges sont placés à 60° ; elle est optimale à 37°, moins marquée à 45° et plus faible encore à 52°. Au contraire, le pouvoir bactériolytique s'exerce encore à 60°.

c) Enfin, le pouvoir gélatinolytique de l'extrait est détruit par un chauffage à 65°, tandis que le pouvoir bactériolytique résiste à 80°.

Tout se passe donc, semble-t-il, comme si les propriétés bactériolytique et gélatinolytique de nos extraits étaient dues à des substances distinctes. Cette conclusion confirme du reste celle

de divers auteurs, tels que Jochmann, qui ont étudié comparativement les pouvoirs protéolytique et bactéricide d'extraits leucocytaires obtenus par d'autres procédés.

CONCLUSIONS

1^o En soumettant des leucocytes à l'action des acides, on peut extraire de ces cellules les substances qui, dans leur intérieur, transforment en granules les bactéries ingérées et les tuent.

2^o En raison des propriétés de ces substances, on ne peut les considérer comme identiques à l'alexine ou à l'un de ses chaînons.

3^o La transformation de certaines espèces microbiennes en granules peut donc être produite par différentes substances de l'organisme.

Conséquemment, on ne peut, sans investigation plus approfondie, la tenir, dans tous les cas, pour la preuve de l'intervention de l'alexine.

4^o Tout se passe comme si les substances bactériolytiques des leucocytes étaient distinctes des ferment protéolytiques de ces cellules.

RECHERCHES SUR LE MÉCANISME DES ACTIONS ANTICOAGULANTES

par le Dr ANDRÉ GRATIA.

Parmi les nombreuses actions anticoagulantes susceptibles de maintenir la fluidité du sang, il en est un certain nombre dont nous ignorons encore complètement le mécanisme. Ayant été amené à poursuivre des recherches dans ce domaine, je me propose d'en rassembler ici les résultats(1). Mais avant d'entrer dans le détail de mes expériences, il importe de situer la question et de rappeler tout d'abord les principales théories qui actuellement tentent d'expliquer le déterminisme normal de la coagulation du sang.

CHAPITRE I

LES THÉORIES MODERNES DE LA COAGULATION DU SANG

Ces théories sont au nombre de trois principales : celle de Bordet et Delange qui est en quelque sorte l'aboutissant le plus parfait de la théorie classique successivement édifiée par Schmidt et ses élèves, par Fuld et Spire, puis par Morawitz; la théorie de Nolf qui s'inspire surtout de la conception originale et révolutionnaire de Wooldridge; et enfin la théorie de Howell qui, sous son apparence plus simple, s'adapte en réalité difficilement aux faits et doit en conséquence entraîner pour se soutenir des complications à l'infini.

Ces théories reconnaissent, toutes, l'intervention, dans la coagulation du sang, de trois substances fondamentales, à savoir : une substance humorale thermolabile, une substance cellulaire thermostable et le fibrinogène. Bien qu'il s'agisse

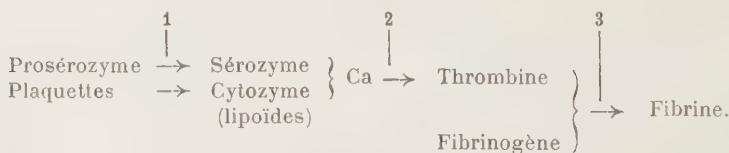
(1) Les principaux résultats de ces recherches ont déjà été résumés dans différentes notes parues dans les *C. R. de la Soc. de Biol.*, 83, 1920.

vraisemblablement toujours des trois mêmes substances, quelle que soit la théorie, leurs noms et leurs attributions varient beaucoup selon les auteurs.

1^o THÉORIE DE BORDET ET DELANGE (1).

D'après Bordet et Delange, la substance cellulaire ou *cytozyme* est un lipoïde existant dans toutes les cellules, mais plus spécialement à l'intérieur des plaquettes. Quant à la substance humorale ou *sérozyme*, elle existe dans le plasma circulant à l'état inactif de *prosérozyme*. Ce n'est qu'au moment de la coagulation qu'elle apparaît sous la forme active de sérozyme dont on retrouve l'excédent dans le sérum après la coagulation.

Pour que le sang coagule il faut d'abord que, grâce à l'action de contact exercée par les corps étrangers (2 et 3), le cytozyme sorte des plaquettes et le prosérozyme se transforme en sérozyme actif. Après cet acte préliminaire, le sérozyme et le cytozyme peuvent réagir en présence des sels de calcium pour donner naissance à la *thrombine* qui, dans un troisième stade, enfin, coagule le *fibrinogène*.



2^o THÉORIE DE HOWELL (4).

D'après Howell, la substance humorale ou *prothrombine* (sérozyme) peut être directement transformée en thrombine par les sels de calcium. Mais cette transformation est entravée, dans le plasma circulant, par une substance antagoniste, l'*antithrombine*. La substance cellulaire ou *thromboplastine* qui, comme dans la théorie précédente, est un lipoïde existant dans les

(1) BORDET et DELANGE. Ces *Annales*, septembre 1912, **26**, p. 657; Mai 1913, **27**, p. 342.

(2) A. GRATIA. *Journ. de Physiol. et de Pathol. génér.*, 1917.

(3) A. GRATIA. *C. R. Soc. Biol.*, novembre 1919.

(4) HOWELL. *Amer. Journ. Physiol.*, 1910, **26**, p. 453; 1912, **29**, p. 187; **31**, p. 1, 32, p. 264; **33**, p. XIII; **34**, p. 143, 476, 483; **35**, p. 1.

plaquettes et dans les tissus, n'aurait d'autre but que de neutraliser l'antithrombine au sortir des vaisseaux et permettre ainsi la production de la thrombine sans entrer dans sa constitution.



Ainsi que Bordet l'a montré déjà dans son dernier mémoire (1), cette théorie est incompatible avec un certain nombre de faits et se heurte *a priori* à toute une série d'objections de principe. Nous verrons d'ailleurs que lorsque nous la soumettrons plus loin à la vérification expérimentale, elle ne résiste pas à la critique.

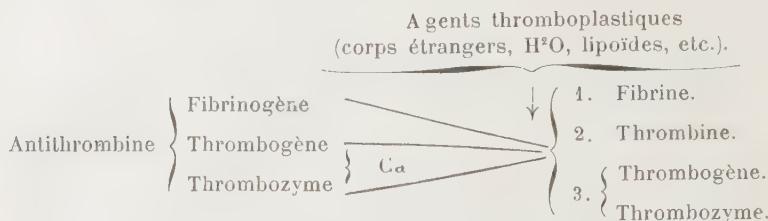
3^o THÉORIE DE NOLF (2).

Pour Nolf, enfin, il existe en abondance dans le plasma trois colloïdes équivalents : le *fibrinogène*, le *thrombogène* (sérozyme) et le *thrombozyme* (cytozyme). Ces trois colloïdes sont maintenus dans un état d'équilibre correspondant à la fluidité par des influences antagonistes (antithrombine). Mais si cet équilibre est rompu par des *agents thromboplastiques* (corps étrangers, précipités colloïdaux, plaquettes, sucs de tissus, *lipoides*, microbes, eau distillée, chloroforme, etc.), les trois colloïdes se combinent mutuellement en proportions variables pour donner toute une série de complexes plus ou moins saturés de fibrinogène. L'on obtiendra ainsi des complexes de thrombogène et de thrombozyme, riches en fibrinogène, c'est la fibrine ; des complexes de thrombogène et de thrombozyme, privées de fibrinogène, c'est la thrombine ; et enfin, il restera encore du thrombogène et du thrombozyme non combinés. La thrombine, conformément à l'opinion déjà ancienne de Wooldridge, serait donc un produit de la coagulation au même titre que la fibrine ; c'est parce qu'elle n'est pas saturée de fibrinogène et, par conséquent, instable, qu'elle se saturera, se stabilisera.

(1) BORDET. *Ces Annales*.

(2) NOLF. *Arch. intern. de Physiol.*, 4, p. 1; 4, p. 1; 6, p. 1, 115 et 306; 7, p. 280, 379 et 411; 9, p. 205; 10, p. 37.

lisera, bref, donnera de la fibrine dès qu'on la mettra en présence de fibrinogène ; mais ce fait serait donc la conséquence même de la coagulation et non pas la cause obligée de celle-ci.



Cette conception séduit surtout par ce qu'elle a de spéculatif, si je puis dire, dans son interprétation. Mais c'est justement son côté faible, celui qui a le moins de soutien expérimental. Il repose tout entier sur le rôle actif que Nolf attribue au fibrinogène. Or, les expériences tout à fait concordantes que Bordet (1) d'une part, et moi-même (2) d'autre part, avons réalisées sur la production de la thrombine, en absence de fibrinogène, montrent que celui-ci ne joue aucun rôle dans cette production. Il est la substance coagulable purement passive. Dès lors, la thrombine est bien la substance active ; elle n'est pas un produit de la coagulation, mais bien la cause de ce phénomène.

La théorie de Nolf ainsi épurée de ses considérations spéculatives est en concordance avec la théorie de Bordet et Delange. La thrombine est un complexe de deux substances unies en présence de calcium : le thrombogène et le thrombozyme. Or, le thrombogène affecte avec le sérozyme une étroite ressemblance : tous deux sont thermolabiles ; tous deux donnent de la thrombine en s'unissant, en présence de calcium, au produit des cellules ; tous deux se consomment par cette réaction. Nolf attribue au thrombogène une origine hépatique ; j'ai montré que le sérozyme est sécrété par le foie (3).

Biologiquement, le thrombozyme et le cytozyme, eux aussi, sont identiques ; tous deux sont sécrétés par les leucocytes, par les plaquettes et se trouvent dans les sucs de tissus ; tous deux

(1) BORDET. *C. R. Soc. belge Biol.*, octobre 1919.

(2) A. GRATIA. *C. R. Soc. Biol.*, novembre 1919.

(3) A. GRATIA. *Bull. Soc. roy. Sc. méd. et nat. de Bruxelles*, 1914.

donnent de la thrombine en s'unissant, en présence de calcium, à la substance humorale (thrombogène ou sérozyme) et se consomment au cours de cette réaction.

Chimiquement, le thrombozyme n'est pas défini, mais le cytozyme a été reconnu de nature lipoïdique. Il semblerait, par conséquent, tout naturel de continuer le rapprochement et d'admettre que le thrombozyme est lipoïdique. Mais Nolf s'y oppose. Préférant laisser dans l'ombre la nature chimique du thrombozyme, il refuse aux lipoïdes toute participation dans la constitution de la thrombine et les assimile, au contraire, aux agents thromboplastiques. Outre que cette façon de voir complique encore la question, elle ne cadre pas très bien avec les faits. Tandis que les lipoïdes, à l'égal du cytozyme des plaquettes et des sucs de tissus, engendrent de la thrombine lors qu'on les ajoute à du sérum, jamais aucun agent thromboplastique, si énergique soit-il — ni poudre de verre, ni précipité colloidal, ni eau distillée — ajouté au sérum le plus riche en sérozyme, n'aura pareil effet. C'est là le véritable critérium qui rattache donc bien les lipoïdes au cytozyme, et par suite au thrombozyme, et les écarte, au contraire, des agents thromboplastiques.

En fin de compte, nous adopterons la théorie et les méthodes de Bordet et Delange. Nous verrons d'ailleurs que nos recherches leur apportent à diverses reprises de nouvelles confirmations.

CHAPITRE II

LES ACTIONS ANTICOAGULANTES

Le sang qui normalement se coagule au sortir des vaisseaux, peut rester fluide dans une foule de circonstances. Qu'un des multiples facteurs de la coagulation du sang vienne à manquer, ou que la présence d'une substance dite anticoagulante détruise un des principes coagulants ou s'oppose à l'une des phases du phénomène, et le processus se verra arrêté ou tout au moins ralenti. Voici un certain nombre d'exemples de l'espèce.

Si l'on chauffe du plasma à 58°, on en détruit le fibrinogène

ainsi que le sérozyme ; on le rend, par conséquent, désormais incoagulable.

Nous savons que le foie sécrète le fibrinogène et le sérozyme. Nous comprenons, dès lors, que toute insuffisance fonctionnelle de cet organe compromette le processus de la coagulation du sang ; les intoxications aiguës par le chloroforme, le phosphore ou l'arsenic tout comme aussi l'ablation expérimentale du foie chez les animaux, s'accompagnent d'incoagulabilité sanguine. Dans bien des affections hépatiques, d'ailleurs, l'on observe des troubles de la coagulabilité.

Bordet et Delange ont observé que le précipité colloïdal de phosphate tricalcique a la propriété d'adsorber le sérozyme ; aussi, du plasma phosphaté, c'est-à-dire du plasma qui a subi l'action adsorbante du phosphate tricalcique, reste fluide faute de sérozyme.

Moins un plasma contient de cellules et moins il est apte à se coaguler ; dans certains cas même, il peut rester complètement fluide ; il en est ainsi, par exemple, pour le plasma d'oiseau, encore appelé plasma de Delezenne, du nom de ce savant qui le premier réalisa l'expérience, et pour le plasma filtré sur bougie Berkefeld. Privés de cellules, ces plasmas ne contiennent plus ou presque plus de cytozyme et restent fluides aussi longtemps qu'on ne leur en restitue pas, sous la forme soit de plaquettes, soit de sucs de tissus, soit de lipoïdes.

De même, Zak (1) rendait incaogulable du plasma de cheval en le délipoïdant par extraction à l'éther de pétrole. Ce plasma délipoïdé et, par conséquent, privé de cytozyme, se coagule si on lui rend des lipoïdes.

On sait que parmi les venins, il en est qui sont hémolytiques en même temps qu'anticoagulants. Or, précisément, les recherches de Delezenne (2) ont montré que l'action hémolytique de ces venins est indirecte : c'est en dissociant la lécitine qu'ils donnent naissance à un produit très hémolytique : la *lysocithine*. Si donc ces venins sont capables de dissocier les

(1) EMIL ZAK. *Arch. f. exp. Pathol. und Pharmak.*, **70**, 18 octobre 1912.

(2) DELEZENNE et FOURNEAU. *Bull. Soc. chim.*, 4^e série, **15** et **16**, p. 354 et 421. — DELEZENNE et LEDERT. *C. R. Acad. Sc.*, **153**, p. 81; *C. R. Soc. Biol.*, **74**, p. 121.

lipoïdes, ils détruisent du même fait le cytozyme, d'où leur action anticoagulante, ainsi que Houssay et Sordelli (1) l'ont encore confirmé récemment.

Il serait assez curieux de rapprocher de l'action de ces venins le pouvoir anticoagulant que j'ai dernièrement reconnu au streptocoque hémolytique, lorsqu'on le laisse se développer dans du sang ou du plasma oxalaté (2). Le streptocoque doit-il, comme les venins, ses actions à la fois hémolytiques et anticoagulantes à un pouvoir lipolytique ? C'est ce qu'il est fort logique de supposer en attendant que l'expérience nous donne sur ce point une réponse probante.

Le sang reste donc fluide s'il est privé d'une des trois substances indispensables à toute coagulation normale, à savoir : le fibrinogène, le sérozyme et le cytozyme. Mais, même lorsqu'il les possède toutes trois en quantités suffisantes, il ne se coagulera pas, s'il ne réalise pas en même temps les conditions favorables à leur réaction.

Ainsi, comme nous l'avons dit plus haut, en exposant la théorie de Bordet et Delange, pour se coaguler le sang doit tout d'abord percevoir le contact d'un corps étranger. Les tissus, en dehors de leur apport de cytozyme, exercent cette action de contact avec la plus grande intensité, le verre également; par contre, la vaseline, et surtout la paraffine, l'exercent très peu et l'endothélium vasculaire pas du tout. C'est pourquoi le sang se coagule si vite dans un récipient en verre, si lentement dans un tube paraffiné, et pas du tout dans un segment de veine isolé entre deux ligatures.

Le froid, la forte concentration saline, le glucose sont anticoagulants parce qu'ils s'opposent à la réaction sérozyme-cytozyme. De même, si les agents décalcifiants (oxalates, citrates et fluorures alcalins) sont anticoagulants, c'est précisément parce que, sans calcium, la réaction sérozyme-cytozyme ne peut se faire.

Il est aussi des agents anticoagulants dont le mode d'action n'a pas encore été étudié, tels sont notamment les sels de

(1) HOUSSAY et SORDELLI. *Journ. de Physiol. et de Pathol. génér.*, n° 4, 18, p. 781.

(2) A. GRATIA. Actions diverses des microbes sur la coagulation du sang. *C. R. Soc. belge Biol.*, novembre 1919.

terres rares, dont les curieuses propriétés anticoagulantes ont été observées par Frouin.

Et nous arrivons enfin aux substances anticoagulantes proprement dites, celles qui, sans qu'on puisse tout à fait dire d'elles qu'elles sont physiologiques, sont néanmoins élaborées par des êtres vivants, soit au cours de l'activité normale, soit en réponse à des excitations pathologiques ou expérimentales. Ces substances, qu'on désigne sous le terme général d'*antithrombine*, ont la propriété, comme leur nom l'indique, de neutraliser la thrombine. En réalité, il faut distinguer différentes antithrombines. Certaines se rencontrent à l'état normal dans la tête des sangsues (*hirudine*), dans la tête de quelques parasites, les sclérostomes par exemple, dans l'hépatopancréas de l'écrevisse; il y en aurait aussi dans le venin de divers serpents. Mais il existe aussi une antithrombine que le foie des animaux, et plus particulièrement celui du chien, sécrète en abondance, lorsqu'on injecte rapidement dans la circulation certains produits, tels que la peptone, par exemple, qui ne sont pas anticoagulants par eux-mêmes. Par le fait de cette sécrétion anormale d'antithrombine, le sang devient incoagulable et donne après centrifugation un plasma stable et anticoagulant, qui est le *plasma de peptone*. Une semblable sécrétion se produit aussi au cours du choc anaphylactique. L'injection déchaînante d'un antigène vis-à-vis duquel l'animal est sensibilisé a pour résultat, tout comme l'injection de peptone, de rendre le sang incoagulable et anticoagulant.

Il est bien d'autres manifestations anticoagulantes sur lesquelles nous ne pouvons nous étendre de peur de nous égarer. Tels sont les effets des injections intraveineuses de sucs de tissus, d'extraits microbiens ou de certains venins. Telle aussi la production d'un sérum contenant une antithrombine anti-lapin que Bordet et Gengou ont réalisée en préparant des cobayes à l'aide de sang de lapin.

Nous devons forcément limiter le cadre de nos recherches, c'est pourquoi nous nous arrêterons pour le moment à l'étude exclusive de l'*hirudine* et de l'*antithrombine* du plasma de peptone.

CHAPITRE III

LE PLASMA DE PEPTONE

La sécrétion par le foie d'une antithrombine capable de maintenir la fluidité du sang à la suite d'une injection intraveineuse brusque de peptone chez le chien, est un fait trop classique pour que nous nous y arrêtons ici.

Le mécanisme de cette réaction nous est cependant encore inconnu. *In vitro*, la peptone n'a aucune propriété anticoagulante; au contraire, convenablement neutralisée, elle manifeste des actions nettement coagulantes grâce au cytozyme qu'elle a hérité des tissus dont elle provient et qui, en tant que lipoïde, a résisté à la digestion pepsinique (Bordet et Delange). On pourrait se demander si la sécrétion d'antithrombine par le foie à la suite de l'injection de peptone n'est pas une simple réaction de défense de l'organisme contre le cytozyme coagulant que la peptone introduit avec elle dans la circulation. Cette hypothèse paraissait d'autant plus plausible que les injections de sucs de tissus, riches aussi en cytozyme, déterminent l'incoagulabilité du sang. En vérité, en injectant du cytozyme lipoidique, extrait tant de la peptone que de divers tissus de chien ou de lapin, je n'ai jamais obtenu la moindre réaction anticoagulante chez le chien; au contraire, le cytozyme se comporte *in vivo* comme *in vitro*: il rend le sang plus coagulable (1). Ces résultats sont d'accord avec ceux que Bordet et Delange ont obtenus chez le lapin (2).

En somme, on ne sait pas encore actuellement à quoi la peptone doit ses effets, mais aussi bien, c'est là un point de vue sur lequel nous ne pouvons insister ici, car ce qui nous intéresse c'est surtout les propriétés du plasma de peptone et le mécanisme par lequel l'antithrombine qui s'y trouve, en maintient la fluidité.

Nous possédons différents moyens de provoquer une coagulation complète et rapide du plasma de peptone. Ils peuvent être de trois ordres :

(1) A. GRATIA. *Bull. Soc. roy. Sc. méd. et nat. Bruxelles*, mai 1913.

(2) BORDET. *Ibidem*, août 1913.

1^o On peut compenser l'antithrombine en ajoutant une assez grande quantité de thrombine toute faite.

2^o On peut aussi, au lieu d'ajouter de la thrombine, susciter, au sein du plasma de peptone même, une production abondante et rapide de thrombine autonome, en ajoutant un supplément de cytozyme sous forme de plaquettes, de sucs de tissus ou de lipoïdes.

3^o On peut enfin, sans ajouter aucun supplément de thrombine ou de ses générateurs, créer des conditions de milieu qui, dans la lutte entre les substances coagulantes du plasma et l'antithrombine, font pencher la balance en faveur des premières. Ces conditions de milieu favorables peuvent être réalisées par l'addition au plasma de certains agents que Nolf appelle *agents thromboplastiques*. Ce sont notamment : l'eau distillée, les sels neutres, les acides, un courant de CO₂, que Fano avait découverts. Nolf y ajoute : les corps pulvérulents, certains précipités colloïdaux (oxalate ou fluorure de calcium, à l'état colloïdal), les sucs de tissus et même les lipoïdes.

Que l'addition de thrombine ou de cytozyme fasse coaguler le plasma de peptone, cela se conçoit aisément, aussi je ne m'y arrête pas davantage pour le moment. En ce qui concerne les agents thromboplastiques, il y a lieu de remarquer que ce terme masque notre ignorance et fait un peu songer aux « vertus dormitives de l'opium ». Bien entendu, on sait que ces corps n'apportent aucune substance capable d'entrer dans la constitution de la thrombine ou de la fibrine ; ce ne sont pas des agents déterminants de la coagulation, mais seulement des favorisants. En réalité, quel assemblage de facteurs disparates ils représentent ! Quelle relation peut-on, par exemple, établir entre l'eau distillée, les acides, les corps pulvérulents ? Il nous serait même bien difficile de dire s'ils favorisent la coagulation ou bien en secondant directement l'action des substances coagulantes, ou bien, au contraire, indirectement en paralysant les substances anticoagulantes telles que l'antithrombine. Il est probable que les deux éventualités peuvent se présenter et si nous pouvions nous baser sur des impressions, nous tendrions volontiers à dire que l'eau distillée aide les réactions coagulantes, tandis que le CO₂ paralyse l'antithrombine. L'eau distillée, en effet, favorise beaucoup la coagulation du plasma

oxalaté recalcifié de mammifères, et aussi du plasma d'oiseau, alors que le CO_2 n'est actif que sur le plasma de peptone.

Cette différence entre l'eau distillée et le CO_2 est plutôt déconcertante. La première idée, en effet, qui vient à l'esprit c'est que l'eau distillée, le CO_2 , les acides, ont un mode d'action commun qu'ils doivent à leur influence précipitante sur les globulines. Malheureusement, comme on le voit, les faits ne paraissent pas justifier suffisamment cette hypothèse.

Quant aux corps pulvérulents, aux précipités colloïdaux, ils représentent un énorme déploiement de surface, qui exerce par conséquent des actions de contact particulièrement efficaces, mais sur le mécanisme desquelles nous sommes encore insuffisamment renseignés.

* * *

Et maintenant comment interpréter la coagulation du plasma de peptone par les lipoïdes? Ce fait, que déjà Wooldridge avait observé, mérite que nous nous y arrêtons plus longuement, car il s'y attache un gros intérêt doctrinal. C'est, en effet, autour de cette question du rôle des lipoïdes dans la coagulation du sang que surgissent les principales divergences d'opinion entre les trois théories modernes, qu'elle peut en quelque sorte servir à caractériser.

Selon Howell, comme nous l'avons déjà dit, les lipoïdes neutraliseraient chimiquement l'antithrombine. Nous verrons plus loin que cette conception ne se vérifie pas.

Pour Bordet et Delange, les lipoïdes représentent la substance active des plaquettes et des sucs de tissus, c'est-à-dire le cytozyme qui, par sa réaction avec le sérozyme du plasma, donne de la thrombine. C'est donc en tant que générateurs de thrombine que les lipoïdes sont susceptibles de faire coaguler le plasma de peptone.

A cette façon de voir, Nolf objecte que le plasma de peptone contient en quantité tous les éléments nécessaires à sa coagulation et que, par conséquent, il n'a besoin d'aucun supplément de substance active. Les lipoïdes ne lui apportent donc rien d'essentiel qui soit susceptible d'entrer dans la constitution même de la thrombine. Ce sont des agents thromboplastiques

qui font coaguler le plasma de peptone, de la même façon que l'eau distillée, le CO₂ ou les précipités colloïdaux, c'est-à-dire en rompant l'équilibre dans lequel l'antithrombine maintient les trois colloïdes générateurs de fibrine.

C'est un point de vue auquel nous ne pouvons nous rallier. Assurément, si nous faisons traverser le plasma de peptone par un courant de CO₂, il se coagule parfaitement et donne un sérum dépourvu d'antithrombine et riche, au contraire, en thrombine. Un tel plasma contenait donc bien tous les éléments nécessaires à sa coagulation et notamment le cytozyme. Mais si ce cytozyme est suffisant lorsque le CO₂ a paralysé l'antithrombine et transformé, en somme, le plasma de peptone en un plasma normal, il n'en est pas du tout de même quand on abandonne le plasma de peptone à lui-même, c'est-à-dire à l'influence prépondérante de son antithrombine intacte. Pour compenser l'action de celle-ci, le plasma de peptone a parfaitement besoin d'un supplément de cytozyme que les lipoïdes peuvent lui apporter.

Au demeurant, la similitude d'effets entre l'addition de lipoïdes et celle des agents thromboplastiques, qui motive l'opinion de Nolf, ne donne que l'illusion d'une similitude d'action. En fait, la différence saute aux yeux, lorsqu'on se place sur un autre terrain; nous l'avons déjà dit, tandis que les lipoïdes ajoutés à du sérum y font naître, tout comme les plaquettes ou les sucs de tissus, une grande quantité de thrombine, jamais aucun agent thromboplastique, si énergique soit-il, ajouté au sérum le plus riche en sérozyme, ne produira le même effet. Du reste, même en se cantonnant sur le terrain du plasma de peptone, on peut se rendre compte, ainsi que le prouve l'expérience suivante, de la différence qui sépare les lipoïdes des agents thromboplastiques.

EXPÉRIENCE I.— On récolte du plasma de peptone faible. On en abandonne une portion à la sédimentation spontanée, tandis que l'on centrifuge le reste énergiquement. On divise, à son tour, le plasma centrifugé en deux parties: l'une qu'on laisse telle quelle et l'autre qu'on filtre sur bougie Berkefeld, et doat on ne recueille que les 5 premiers centimètres cubes. L'on obtient ainsi trois plasmas, dont le premier (plasma sédimenté) est riche en cellules, le second (plasma centrifugé) est pauvre en cellules et le troisième (plasma filtré) en est totalement dépourvu. Additionnés de deux volumes d'eau distillée, le plasma sédimenté se coagule en une heure, le plasma centrifugé en trois heures, et le plasma filtré pas du tout. Soumis à un courant d'anhy-

dride carbonique, le plasma sédimenté se coagule en dix minutes, le plasma centrifugé en dix-sept minutes et le plasma filtré reste indéfiniment fluide.

Arrêtons-nous à cette première partie de l'expérience pour constater que, contrairement à l'opinion de Wooldridge et conformément à ce qu'ont soutenu la plupart des auteurs, tels que Fano, Athanasiu et Carvallo, un plasma de peptone est d'autant plus apte à se coaguler sous l'influence des agents thromboplastiques qu'il est plus riche en cellules, c'est-à-dire en cytozyme.

Nous venons de voir que l'eau distillée et l'anhydride carbonique sont impuissants à faire coaguler un plasma de peptone privé de cytozyme par la filtration; il est à prévoir qu'ils redeviendront efficaces dès qu'on rendra au plasma de peptone filtré, du cytozyme et, notamment, des lipoïdes, s'il est bien exact que les lipoïdes sont du cytozyme, comme le pensent Bordet et Delange. Et c'est bien ce que la suite de notre expérience vérifie.

Reprendons le plasma filtré et répartissons-le, à raison de 0,5 cent. cubes par tube, entre deux séries de trois tubes: *a*, *b*, *c* et *a'*, *b'*, *c'*. Dans *a* et *b*, on verse 1 cent. cube d'eau distillée et dans *c* 1 cent. cube d'eau physiologique; on ajoute de plus à *b* et à *c*, une goutte d'une émulsion diluée de lipoïdes: *a* et *c* restent fluides, *b* se coagule en une heure.

a' et *b'* sont soumis à un courant d'anhydride carbonique, *c'* à un courant d'air; on ajoute une goutte de lipoïdes à *b'* et à *c'*: *a'* et *c'* restent fluides, *b'* se coagule en quinze minutes.

	AGENTS THROMBOPLASTIQUES	LIPOÏDES	TEMPS DE COAGULATION
<i>a</i>	Eau distillée, 1 cent. cube	»	∞ (1)
<i>b</i>	Eau distillée, 1 cent. cube	Une goutte.	1 heure.
<i>c</i>	Eau physiologique, 1 cent. cube . . .	Une goutte.	∞
<i>a'</i>	Anhydride carbonique.	»	∞
<i>b'</i>	Anhydride carbonique.	Une goutte.	15 minutes.
<i>c'</i>	Air	Une goutte.	∞

(1) Le signe ∞ signifie : reste indéfiniment fluide.

Ainsi donc, l'eau distillée et l'anhydride carbonique ne peuvent faire coaguler le plasma de peptone qu'au prorata de sa teneur en cytozyme. Et lorsque, à la suite de la filtration, le

plasma de peptone a perdu, en même temps que son cytozyme, toute aptitude à se coaguler sous l'action des agents thrombo-plastiques (a et a'), il la récupère dès qu'on l'additionne d'une petite quantité de lipoïdes (b et b'), insuffisante pour avoir un effet coagulant par elle seule (c et c'). On a nettement l'impression qu'on a restitué au plasma de peptone filtré le cytozyme dont la filtration l'avait privé. Conformément à l'opinion de Bordet et Delange, les lipoïdes remplacent donc bien le cytozyme cellulaire.

Le débat se répète identique, d'ailleurs, au sujet du plasma d'oiseau. L'addition de lipoïdes est capable, en effet, de faire coaguler un plasma stable d'oiseau et ce, d'après Bordet et Delange, parce qu'on lui rend ainsi le quantum de cytozyme nécessaire dont la centrifugation l'avait dépouillé. Pour Nolf, au contraire, les lipoïdes n'ajoutent absolument rien d'indispensable au plasma d'oiseau, puisque l'eau distillée le fait coaguler aussi bien qu'eux. Sans doute, mais encore une fois, ce n'est pas une raison pour identifier les deux mécanismes. Si l'eau distillée fait coaguler le plasma d'oiseau, c'est au protara de la teneur du plasma en cytozyme. L'on peut, en effet, observer que l'eau distillée fait d'autant moins bien coaguler le plasma d'oiseau que celui-ci a été mieux récolté, c'est-à-dire qu'il contient moins de cytozyme libre. Aussi, peut-on croire qu'un plasma d'oiseau, idéalement privé de cytozyme (1), resterait complètement indifférent à l'addition d'eau distillée. Voici du reste une expérience dans laquelle nous nous rapprochons très fort de cet idéal.

EXPÉRIENCE II. — En suivant la technique de Delezenne, j'ai obtenu récemment un plasma dont un échantillon, conservé en tube stérile, était encore fluide et stérile après un mois. Additionné de deux volumes d'eau distillée, ce plasma se maintenait fluide pendant deux jours et ce n'est que le troisième jour qu'il présentait au ménisque supérieur un petit anneau de fibrine, qui ne s'est d'ailleurs pas étendu au restant de la masse. Si, au contraire,

(1) Il est très difficile, je dirai même impossible, de récolter du plasma d'oiseau idéalement dépourvu de cytozyme libre. On conçoit qu'il doit toujours être un peu souillé, soit au contact de la plaie artérielle au cours de la saignée, soit par ce qui s'échappe des leucocytes au cours de la centrifugation. Ces traces de cytozyme, insuffisantes pour permettre la coagulation spontanée du plasma d'oiseau, deviennent suffisantes lorsque l'addition d'eau distillée diminue la concentration saline et réalise ainsi des conditions beaucoup plus favorables au processus.

en même temps que l'eau distillée, on ajoutait une goutte de lipoïde, l'on provoquait une coagulation massive en quinze minutes.

Ce plasma d'oiseau qui, en raison de sa pauvreté en cytozyme, n'avait quasi aucune aptitude à se coaguler par l'addition d'eau distillée, l'acquérait aussitôt qu'on y ajoutait un peu de lipoïdes. Ici encore, on avait bien l'impression qu'avec cette goutte de lipoïdes, on restituait au plasma d'oiseau ce qui lui manquait, c'est-à-dire le cytozyme cellulaire. Comme le plasma de peptone filtré de l'expérience précédente, ce plasma d'oiseau trahit nettement la distinction qu'il y a lieu de faire entre l'action des lipoïdes et celle des agents thromboplastiques. Tandis que les premiers restituent aux plasmas insuffisamment pourvus le cytozyme qui leur manque, les seconds leur viennent tout simplement en aide et leur permettent de tirer parti de leurs maigres ressources. Chacune de ces actions est capable de provoquer la coagulation d'un plasma stable, mais à sa façon. Et l'effet particulièrement efficace qu'on obtient par leur association ne résulte pas de deux actions similaires qui s'additionnent, mais bien plutôt de deux actions différentes qui se complètent. Déjà Wooldridge réalisait sans s'en douter une semblable association, lorsque, ne parvenant pas à faire coaguler un plasma de peptone fort par la simple addition d'eau distillée, il renforçait l'action de cette dernière par de la lécithine. Une telle combinaison de lipoïdes et d'agents thromboplastiques se trouve d'ailleurs spontanément réalisée dans les sucs de tissus. Outre le cytozyme lipoïdique thermostable, ces derniers contiennent encore des substances thermolabiles à propriétés thromboplastiques très nettes. C'est pourquoi d'ailleurs le chauffage à 60°, qui ne laisse subsister que le cytozyme, diminue notablement l'activité des sucs de tissus. C'est précisément grâce à cette association que les sucs de tissus font si facilement coaguler les plasmas stables tels que le plasma d'oiseau et le plasma de peptone.

* * *

Pour être complet, il resterait encore à parler de la coagulation du plasma de peptone par le *Staphylocoque*, que j'ai pu réaliser au cours de mes recherches sur l'action coagulante de

ce microbe (1). Mais c'est là un mécanisme trop spécial qui n'est d'ailleurs pas encore tout à fait élucidé. Aussi, dans la crainte de compliquer le présent exposé, je ne m'arrêterai pas davantage sur cette question à laquelle je me réserve de consacrer un autre mémoire.

CHAPITRE IV

L'ANTITHROMBINE DU PLASMA DE PEPTONE

L'antithrombine à laquelle le plasma de peptone doit son incoagulabilité est un principe non dialysable et résistant à la chaleur, tout au moins jusqu'à 60°. On ne possède encore que peu d'indications sur sa nature chimique. Pourtant Doyon, Morel et Policard, en soumettant le plasma de peptone au bain-marie bouillant, précipitent ensuite par l'acide acétique dilué, dans le liquide séparé des matières albuminoïdes coagulées par la chaleur, un nucléoprotéide contenant 3 p. 100 de phosphore et capable d'empêcher, *in vitro*, le sang de se coaguler. Ils peuvent également extraire de tous les tissus la même substance anticoagulante qui proviendrait, selon ces auteurs, des noyaux cellulaires des organes. Doyon a trouvé de plus que le sel de soude de tous les acides nucléiniques, quelle que soit leur origine, possède le pouvoir d'empêcher le sang de coaguler et s'oppose à l'action de la thrombine. Il nous est encore tout à fait impossible de dire jusqu'à quel point ces produits sont en relation avec l'antithrombine.

Selon une opinion émise par Dastre et Floresco (2) et reprise plus tard par Mellanby (3), l'antithrombine du plasma de peptone ne serait rien d'autre qu'un excès d'alcali déversé par le foie dans la circulation au moment du choc propeptonique. Ainsi s'expliquerait très simplement pourquoi les acides et notamment un courant de CO_2 font coaguler le plasma de peptone. Malheureusement, on n'a jamais réussi à montrer une différence d'alcalinité quelconque entre le plasma de peptone et le plasma normal. Mellanby explique ce fait en

(1) A. GRATIA. *C. R. Soc. de Biol.*, 1920.

(2) DASTRE et FLORESCO. *Arch. de Physiol.*, 1897, p. 216-228.

(3) MELLANBY. *Journ. of Physiol.*, 1909, **38**, 485.

supposant que le petit excès d'alcali qui suffirait à maintenir la fluidité dans le plasma de peptone se fixe en majeure partie sur les globulines du plasma et échappe par conséquent aux méthodes ordinaires de dosage.

D'après ses calculs, Mellanby estime que l'excès d'alcali du plasma de peptone devrait correspondre à une solution 1/160 N de soude caustique dont, en défaillant la portion fixée, il ne resterait à l'état libre qu'une alcalinité égale à 1/500 N. Pour ma part, en dosant la quantité d'acide chlorhydrique nécessaire pour faire coaguler le plasma de peptone, j'ai pu conclure que l'excès d'alcali, cause présumée de l'incoagulabilité, correspondrait à une solution 1 p. 100 N de NaOH. Cette quantité, surtout si elle se fixe sur les globulines, pourrait peut-être échapper aux méthodes titrimétriques ordinaires, mais elle se révélerait par contre avec la plus grande netteté par la méthode colorimétrique de Mac Marriott qui permet le dosage de la réserve alcaline du plasma sanguin. Grâce à cette méthode (1), j'ai pu, en effet, mettre en évidence très facilement, dans du plasma normal, des traces de soude caustique n'excédant pas une concentration de 1/500 N que j'y avais ajoutées. Or, n'ayant pas réussi, par contre, à montrer la moindre différence d'alcalinité entre le plasma de peptone et le plasma normal, force m'est donc de rejeter l'hypothèse de Mellanby.

Une question qu'il est peut-être utile de résoudre, est de savoir si l'antithrombine est susceptible d'être adsorbée par le précipité colloïdal de phosphate tricalcique. L'expérience suivante, instituée dans ce but, nous montre que du plasma de peptone traité par une grosse quantité de phosphate tricalcique perd une grande partie de ses propriétés anticoagulantes.

EXPÉRIENCE III.—On saigne un chien cinq minutes avant, puis cinq minutes après une injection intraveineuse brusque de 0 gr. 3 de peptone de Witte par kilo. A chacune des deux saignées, on procède de façon identique : on récolte 9 volumes de sang dans 1 volume d'eau physiologique oxalatée à 2 p. 100 (sang oxalaté à 2 p. 1.000), puis on recueille 9 volumes de sang dans un second tube contenant 1 volume d'une suspension très épaisse de phosphate tricalcique (sang phosphaté). On a soin de remuer chaque fois les

(1) Je tiens à remercier vivement M. Zunz d'avoir mis à ma disposition le matériel nécessaire à ces dosages. Sa grande pratique de la méthode m'a été d'un secours précieux et m'est un sûr garant de l'exactitude de mes résultats.

mélanges pour qu'ils soient bien homogènes. On centrifuge pendant une à deux heures les deux échantillons de sang oxalaté, tandis qu'on laisse reposer les deux tubes de sang phosphaté, qu'on centrifuge ensuite à leur tour. Après avoir décanté les quatre plasmas, on dilue les deux plasmas oxalatés à l'aide de quatre volumes d'eau physiologique oxalatée à 2 p. 1.000. Quant aux deux plasmas phosphatés, lesquels sont encore calcifiés, on les dilue d'abord d'un volume d'eau physiologique oxalatée à 4 p. 1.000, puis de 3 volumes d'eau physiologique oxalatée à 2 p. 1.000. On obtient ainsi quatre plasmas dilués oxalatés à 2 p. 1.000, savoir : du plasma normal, du plasma normal phosphaté, du plasma de peptone et du plasma de peptone phosphaté. Ayant d'autre part préparé de la thrombine de Howel, on fait les mélanges suivants : à 0 c.c. 5 de chacun des quatre plasmas oxalatés dilués, on ajoute de la thrombine, à raison de 0 c.c. 2 dans une première série, de 0 c.c. 5 dans une deuxième série et de 1 cent. cube dans une troisième. On lira dans le tableau ci-dessous les temps de coagulation de chacun des plasmas selon les doses de thrombine.

PLASMAS OXALATÉS DILUÉS (0 c.c. 5)	THROMBINE		
	0 c.c. 2	0 c.c. 5	1 c.c.
Plasma normal	6'	4'	4'
Plasma normal phosphaté	5'	3'	4'
Plasma de peptone	∞	∞	∞
Plasma de peptone phosphaté . . .	30'	12'	6'

A doses égales, la thrombine coagule rapidement le plasma normal, plus lentement le plasma de peptone phosphaté et laisse fluide le plasma de peptone non phosphaté. Le phosphate a donc entraîné l'antithrombine du plasma de peptone, mais de façon incomplète.

Il faut conclure de cette expérience que l'antithrombine du plasma de peptone est partiellement adsorbable par de grandes quantités de phosphate tricalcique.

L'hirudine et le plasma hirudiné.

J'ai utilisé dans mes recherches l'hirudine du commerce. Elle se présente sous la forme de petites paillettes brunâtres, facilement solubles dans l'eau et insolubles dans l'alcool. Elle n'est pas dialysable et son activité résiste au chauffage à 60°.

Il suffit d'un milligramme de cette substance, dissous dans

1 cent. cube d'eau physiologique, pour empêcher la coagulation de 7 cent. cubes de sang. Le plasma hirudiné qu'on obtient ainsi est très stable. Il se coagule, lorsqu'on l'additionne de quantités suffisantes, soit de thrombine, soit de cytozyme (sucs de tissus ou lipoïdes). Mais à l'inverse du plasma de peptone, il résiste énergiquement aux agents thromboplastiques tels que l'eau distillée ou les acides. Cette indifférence du plasma hirudiné aux agents thromboplastiques, qui, remarquons-le, établit une nouvelle distinction entre ceux-ci et les lipoïdes, se vérifie quelle que soit la dose, même faible, d'hirudine qu'on ait employée.

EXPÉRIENCE IV. — On prépare : 1^o du plasma de lapin oxalaté à 1 p. 1.000 (P); 2^o une solution physiologique de CaCl² à 5 p. 1.000 (Ca) dont un volume recalcifie amplement quatre volumes du plasma oxalaté; 3^o différentes solutions d'hirudine (H) dans l'eau physiologique (E. P.); 4^o une émulsion de cytozyme lipoïdique (CYT).

A. Action coagulante du cytozyme lipoïdique. — On place à 37° les trois tubes suivants dont on note les temps de coagulation :

	c. c.	c. c.	c. c.
a)	0,4 P.	+	0,1 E. P. + 0,1 Ca = 5;
b)	0,4 P.	+	0,1 H. 2 p. 1.000 + 0,1 Ca = ∞ ;
c)	0,4 P.	+	0,1 H. 2 p. 1.000 + 0,1 Ca + 1 gte Cyt = 30'.

B. Inactivité du CO₂. — On place à 37° deux séries identiques de tubes contenant chacun du plasma oxalaté recalcifié (P.Ca) et de l'hirudine (H) à doses décroissantes. La seconde série se distingue de la première en ce que le plasma qu'elle contient a été préalablement saturé d'anhydride carbonique. On constate que les deux séries donnent des résultats identiques, ce pourquoi je ne reproduis ci-dessous que la première :

0,5 c.c. P.Ca + 0,1 c.c. H à 2,5 p. 1.000 = ∞			
— + — à 2,25 — = ∞			
— + — à 2 — = ∞			
— + — à 1,5 — = ∞			
— + — à 1,2 — = coagule imparfaitement après 30'.			
— + — à 1,1 — = — — —			
— + — à 1 — = — — en 20'			
— + — à 0,75 — = — — en 45'			
— + 0,1 c.c. E. P. — = — — en 5'			

Disons pour terminer que le staphylocoque fait coaguler le plasma hirudiné comme il fait coaguler le plasma de peptone. Mais c'est là un fait un peu spécial sur lequel nous ne pouvons nous arrêter ici.

L'antithrombine et la genèse de la thrombine.

Les travaux de Haycraft, de Dickinson, de Fuld et Spiro et de Morawitz sur l'hirudine, ceux de Morawitz sur l'antithrombine du plasma de peptone ont nettement établi que ces substances sont capables de neutraliser quantitativement la thrombine. Mais il y a tout lieu de croire qu'elles ont en outre le pouvoir de s'opposer à la genèse même du fibrin-ferment.

Si, en effet, le plasma de peptone contenait de la thrombine toute formée, il n'y aurait pas de raison pour que les agents thromboplastiques (eau distillée, acides, anhydride carbonique, etc...) qui font coaguler le plasma de peptone normal ne fassent pas coaguler le plasma de peptone oxalaté. Or, il n'en est rien. Il semble bien aussi que le plasma hirudiné ne contienne pas de thrombine. Les antithrombines opposent donc une entrave à la formation du fibrin-ferment. Comment faut-il l'expliquer? Nos connaissances sur cette question sont encore actuellement des plus confuses. Pour Pekelharing, l'hirudine empêcherait l'altération des cellules sanguines et la libération des agents coagulants que celles-ci contiennent. Mais voici qu'Aynaud déclare, au contraire, que l'hirudine agglutine et altère fortement les plaquettes. Si l'on acceptait la classification d'Arthus, il faudrait ranger l'hirudine et l'antithrombine du plasma de peptone dans la catégorie des antiprothrombines. Selon Howell, les antithrombines et la céphaline se neutraliseraient mutuellement : les premières seraient donc des anticytozymes. Enfin, Bodong pense que l'hirudine modifie la constitution du fibrinogène; elle serait donc un antifibrinogène.

Il importe par conséquent d'éclairer la question à la lumière des faits nouveaux.

CHAPITRE V

ACTION DE L'HIRUDINE SUR LA RÉACTION SÉROZYME-CYTOZYME

Si le plasma hirudiné ne contient pas de thrombine, c'est peut-être que l'hirudine empêche la réaction sérozyme-cylozyme.

Mais comment s'en rendre compte? Je suppose, en effet, qu'un mélange de sérozyme et de cytozyme, opéré en présence d'hirudine, ne fasse pas coaguler le fibrinogène. Comment distinguer si c'est parce que l'hirudine a empêché la réaction sérozyme-cytozyme de se produire, ou bien si c'est parce qu'elle a neutralisé la thrombine issue de la réaction? *A priori* le problème paraît insoluble. Heureusement l'analyse quantitative du phénomène m'a permis d'échapper au dilemme. J'ai, en effet, pu constater qu'une dose d'hirudine, sensiblement inférieure à celle qu'il faut pour neutraliser la thrombine déjà formée, est suffisante pour entraver la réaction sérozyme-cytozyme qui donne naissance à cette même quantité de thrombine.

Mais avant d'exposer ces expériences, il importe de rappeler brièvement la technique que j'ai employée de façon constante pour faire la réaction sérozyme-cytozyme de Bordet et Delange.

Comme cytozyme, je me suis servi de l'antigène de Bordet et Ruelens. On évapore cinq gouttes de la solution alcoolique dans un verre de montre et l'on émulsionne l'extrait sec dans 1 cent. cube d'eau physiologique calcifiée (0,35 p. 1.000 CaCl²). Pour préparer le sérozyme, on centrifuge énergiquement du sang de lapin oxalaté à 1 p. 1.000 afin de le dépouiller le plus possible de ses plaquettes. Après avoir décanté le plasma, on le recalcifie à l'aide de 4 volumes d'EP. Ca (1). La petite quantité de cytozyme qu'il contient ne réagit qu'avec une petite quantité de sérozyme pour donner une petite quantité de thrombine qui fait coaguler lentement le plasma. Si on défibrine à ce moment, on obtient un sérum contenant un peu de thrombine et tout le sérozyme qui n'a pas été consommé. La thrombine disparaissant par vieillissement, le lendemain le sérum ne contiendra plus que le sérozyme et sera prêt à servir.

La stabilité de ce sérozyme peut varier d'une espèce animale à l'autre. Il est assez fragile chez le cobaye et chez le chien; abandonné à la température ordinaire, le sérum de ces animaux est sensiblement affaibli du jour au lendemain et après quelques heures de séjour à 37° il peut perdre toute activité.

(1) EP. Ca: Eau physiologique contenant 0,35 p. 1.000 de CaCl² de sorte que quatre volumes de cette solution recalcifient amplement un volume de plasma oxalaté à 1 p. 1.000.

Le sérozyme de lapin, au contraire, est beaucoup plus résistant et j'ai pu en conserver un stock parfaitement actif pendant plusieurs semaines en le congélan. Il suffit pour cela de maintenir le tube de sérum dans un vase de Dewar dans lequel on entretient un mélange réfrigérant à l'aide de glace et de NaCl.

Lorsqu'on mélange cinq gouttes de sérum riche en sérozyme et une goutte de l'émulsion de cytozyme lipoïdique, on obtient en moins de trois minutes une quantité constante de thrombine capable de faire coaguler très rapidement cinq gouttes de plasma dioxalaté (1).

EXPÉRIENCE V. — Ayant préparé du plasma dioxalaté de lapin (F), du sérum de lapin riche en sérozyme (S) et une émulsion de cytozyme (Cyt.), on fait encore au moment de l'expérience une solution initiale d'hirudine contenant 1 milligr. de cette substance pour 1 cent. cube d'eau physiologique (H 1/1.000) et à partir de laquelle on pourra faire à volonté d'autres solutions plus diluées.

Il s'agit d'abord de rechercher une solution d'hirudine exactement assez diluée pour qu'une goutte de cette solution ne soit plus capable de neutraliser la thrombine produite par la réaction de cinq gouttes de sérozyme avec une goutte de cytozyme.

(5 gouttes S + 1 goutte Cyt.)	3' + 1	—	+ 5 gouttes F	= ↓ 1'
(5 — S + 1 —	3' + 1 —	H 1/1.000 + 5 —	F = ∞	
(5 — S + 1 —	3' + 1 —	H 1/2.000 + 5 —	F = ∞	
(5 — S + 1 —	3' + 1 —	H 1/2.500 + 5 —	F = ∞	
(5 — S + 1 —	3' + 1 —	H 1/2.800 + 5 —	F = ↓ 10'	
(5 — S + 1 —	3' + 1 —	H 1/3.000 + 5 —	F = ↓ 3'	

La solution d'hirudine recherchée est donc intermédiaire entre une solution au 1/2.500, dont une goutte neutralise encore complètement six gouttes de thrombine toute fraîche, et une solution au 1/2.800 qui n'a plus ce pouvoir.

Ce point étant établi, on recherche immédiatement après, avec le même matériel, si la dose d'hirudine, trop faible pour empêcher l'action coagulante de la thrombine toute faite, n'est

(1) On prépare le plasma dioxalaté employé en guise de fibrinogène comme réactif de la thrombine, en diluant du plasma oxalaté à 1 p. 1.000 à l'aide de quatre volumes d'eau physiologique oxalatée à 2 p. 1.000. Il contient ainsi suffisamment d'oxalate pour précipiter son propre calcium et celui de la thrombine qu'on y ajoute.

pas suffisante pour entraver la réaction sérozyme-cytozyme qui donne naissance à cette même quantité de thrombine.

EXPÉRIENCE VI.

(5 gouttes S + 1 goutte H 1/2.500 + 1 goutte Cyt.)	5' + 5	—	F = ∞
(5 — S + 1 — H 1/2.800 + 1 — 5' + 5 — F = ∞			
(5 — S + 1 — H 1/5.000 + 1 — 5' + 5 — F = ∞			
(5 — S + 1 — H 1/10.000 + 1 — 5' + 5 — F = ∞			
(5 — S + 1 — H 1/20.000 + 1 — 5' + 5 — F = ↓ 10'			

Cette expérience tout à fait concluante nous montre que, toutes choses égales d'ailleurs, une solution d'hirudine au 1/10.000 est encore suffisante pour entraver la production de la thrombine, alors qu'il faut une solution au 1/2.500, au moins, pour neutraliser la thrombine formée. Il est ainsi nettement prouvé que l'antithrombine non seulement s'oppose à l'action de la thrombine, mais encore qu'elle paralyse sa genèse en entravant la réaction sérozyme-cytozyme.

Mais cette entrave est-elle absolue, en d'autres termes empêche-t-elle complètement la réaction de se produire, ou bien ne lui apporte-t-elle qu'un simple retard, et dans ce dernier cas quelle en est la durée?

Normalement, comme nous le savons, la réaction s'opère en moins de trois minutes; l'expérience VI nous montre qu'en présence d'une goutte d'hirudine au 1/5.000 elle n'a pas encore produit de thrombine après cinq minutes. Mais soyons plus patient, attendons plus longtemps avant d'arrêter la réaction par l'addition du plasma dioxalaté et voyons si après un certain temps il ne se produira pas, malgré tout, de la thrombine active.

EXPÉRIENCE VII. — (Faite immédiatement après la précédente et avec le même matériel):

(5 gouttes S + 1 goutte H 1/5.000 + 1 goutte Cyt.)	5' + 5 gouttes	F = ∞
(5 — S + 1 — H 1/5.000 + 1 — 10' + 5 — F = ∞		
(5 — S + 1 — H 1/5.000 + 1 — 15' + 5 — F = ∞		
(5 — S + 1 — H 1/5.000 + 1 — 20' + 5 — F = ∞		
(5 — S + 1 — H 1/5.000 + 1 — 25' + 5 — F = ↓ 5'		

En présence d'une goutte d'hirudine au 1/5.000, la réaction sérozyme-cytozyme s'est faite en vingt-cinq minutes, au lieu de trois minutes.

Une dose d'hirudine, insuffisante pour neutraliser complètement de la thrombine déjà formée, n'est pas capable d'arrêter de façon radicale la réaction sérozyme-cytozyme qui produit cette même quantité de thrombine, mais elle la retarde notablement. Il est vraisemblable que des doses un peu plus élevées la paralyseraient complètement.

En présence d'une petite quantité d'hirudine, la réaction sérozyme-cytozyme, simplement retardée, finit donc par triompher de cette hirudine; mais de quelle façon? L'hirudine serait-elle à la longue neutralisée, soit par le sérozyme, soit par le cytozyme lipoïdique? C'est, en effet, comme nous l'avons déjà dit plus haut, l'opinion de Howell que les lipoïdes neutralisent chimiquement l'hirudine. Nous allons pouvoir nous rendre compte très aisément s'il en est bien ainsi par l'expérience suivante faite toujours avec le même matériel. Il suffira pour cela de voir si l'hirudine, qui est vaincue au bout d'un certain temps par l'action synergique du sérozyme et du cytozyme, peut être neutralisée au bout du même temps au contact soit du sérozyme seul, soit du cytozyme seul.

EXPÉRIENCE VIII.

(5 gouttes S + 1 goutte H 1/5.000 + 1 goutte Cyt.)	183'	+	5 gouttes F	=	↓ 45'
(5 — S + 1 — H 1/5.000)	180'	+	1 goutte Cyt. 3'	+	5 — F = ∞
(5 — Cyt. + 1 — H 1/5.000)	180'	+	5 gouttes S 3'	+	5 — F = ∞

On voit donc que le cytozyme seul, pas plus d'ailleurs que le sérozyme seul, ne peut neutraliser l'hirudine. Pour vaincre celle-ci, il ne suffit pas de l'une ou de l'autre de ces substances coagulantes, il faut le concours des deux. Il ne s'agit pas, comme le pense Howell, d'une neutralisation chimique de l'hirudine par le cytozyme lipoïdique; c'est le résultat du conflit entre deux actions de sens opposés; c'est la force de cohésion tendant à unir le cytozyme au sérozyme qui triomphe de l'action dispersante de l'hirudine.

Dans les expériences précédentes, nous avons toujours opéré la réaction sérozyme-cytozyme avec une quantité de cytozyme déterminée, assez forte d'ailleurs. Dans ces conditions, si nous appelons *limite maxima* la dose d'hirudine nécessaire pour neutraliser la thrombine toute faite, et *limite minima* la dose d'hirudine suffisante pour entraver la réaction sérozyme-

cytozyme, nous constatons que la première s'établit entre une solution d'hirudine au 1/2.500 qui neutralise complètement la thrombine, et une solution d'hirudine au 1/2.800 qui ne la neutralise plus complètement. Quant à la limite minima, nous voyons qu'elle est intermédiaire entre une solution d'hirudine au 1/10.000 qui entrave encore la réaction et une solution au 1/20.000 qui ne l'entrave plus.

Que deviennent ces limites, si nous faisons varier les quantités de cytozyme employées dans la réaction sérozyme-cytozyme?

EXPÉRIENCE IX.— Utilisons toujours le même matériel que dans les expériences précédentes, à cela près que l'émulsion de cytozyme est diluée au 1/20. Dans ce cas, nous constatons que les limites susdites diminuent notablement. La limite maximale s'établit, en effet, entre 1/10.000 et 1/20.000, et la limite minimale entre 1/40.000 et 1/80.000.

Par conséquent, lorsqu'on diminue la quantité de cytozyme qu'on emploie dans la réaction sérozyme-cytozyme, les quantités d'hirudine nécessaires, soit pour neutraliser la thrombine que produit la réaction, soit pour entraver la réaction elle-même, diminuent en conséquence. Cette corrélation n'implique nullement une neutralisation mutuelle de l'hirudine et du cytozyme. Il va de soi qu'ayant modifié un facteur de condensation, le cytozyme, il faut, pour rétablir la balance, modifier concurremment le facteur de dispersion, l'hirudine. Il est à prévoir que les quantités limites d'hirudine varieront aussi si l'on modifie la quantité ou la qualité du sérozyme employé dans la réaction. Je n'ai pas fait d'expériences dans ce sens, cependant ayant répété deux jours de suite dans des conditions identiques les mêmes mensurations avec le même sérum de chien, j'ai obtenu le second jour des limites sensiblement inférieures à celles de la veille. C'est que le sérozyme du chien étant assez labile, son activité était beaucoup plus faible le second jour que le premier et ne pouvait donc former autant de thrombine que la veille. En somme, l'on peut dire que la limite supérieure d'hirudine varie avec la quantité de thrombine formée, et la limite inférieure, avec la quantité de thrombine susceptible de se former et que j'appellerais volontiers la *thrombine latente*.

CHAPITRE VI

ACTION DE L'ANTITHROMBINE DU PLASMA DE PEPTONE
SUR LA RÉACTION SÉROZYME-CYTOZYME

Le plasma de peptone ne contient pas de thrombine puisque les agents thromboplastiques qui font coaguler le plasma de peptone normal sont sans effet sur le plasma de peptone oxalaté.

Comme l'hirudine, l'antithrombine s'oppose donc à la genèse de la thrombine. Aussi faut-il prévoir qu'elle se comportera de la même façon que l'hirudine vis-à-vis de la réaction sérozyme-cytozyme. Et c'est ce que l'expérience vérifie. On observe, en effet, que si l'on fait plusieurs dilutions d'antithrombine, il existe à ces dilutions une limite maxima nécessaire pour neutraliser la thrombine toute faite, et une limite minima suffisante pour entraver la réaction sérozyme-cytozyme.

EXPÉRIENCE X. — On prépare du plasma dioxalaté de chien (F), du sérum de chien riche en sérozyme (S), une émulsion de cytozyme lipoïdique (Cyt.), et enfin du plasma de peptone (P.P.) récolté 10' après l'injection brusque de peptone de Witte à raison de 0 gr. 3 per kilo dans la jugulaire d'un chien. Au cours de l'expérience on fera, à l'aide d'eau physiologique (E.P.), les dilutions de plasma de peptone qu'on désire.

(5 gouttes S + 1 goutte Cyt.)	3'	+	1 goutte E.P.	+	5 gouttes F	=	↓ 1'
(5 — — S + 1 — — 3' + — — P.P. + 5 — — F = ∞							
(5 — — S + 1 — — 3' + — — 1/2 P.P. + 5 — — F = ∞							
(5 — — S + 1 — — 3' + — — 1/3 P.P. + 5 — — F = ∞							
(5 — — S + 1 — — 3' + — — 1/4 P.P. + 5 — — F = ↓ 3'							

La limite maxima, c'est-à-dire la plus petite dose d'antithrombine encore capable de neutraliser la thrombine toute faite, est donc intermédiaire entre la dilution du plasma de peptone au tiers et la dilution au quart.

Voyons quelle sera la limite minima, c'est-à-dire la dilution d'antithrombine encore suffisante pour entraver la réaction sérozyme-cytozyme.

EXPÉRIENCE XI.

(5 gouttes S + 1 goutte 1/4 P.P. + 1 goutte Cyt.)	3'	+	5 gouttes F = ∞	.
(5 — — S + 1 — — 1/10 P.P. + 1 — — 3' + 5 — — F = ∞				
(5 — — S + 1 — — 1/15 P.P. + 1 — — 3' + 5 — — F = ↓ 5'				

La limite minima est donc un peu supérieure à la dilution au 1/15.

Dans quelle mesure l'antithrombine entrave-t-elle la réaction sérozyme-cytozyme? Produit-elle un arrêt radical de la réaction ou simplement un retard?

EXPÉRIENCE XII.

(5 gouttes S + 1 goutte P.P. 1/4 + 1 goutte Cyt.)	3'	+	5 gouttes F	=	∞	
(5 — S + 1 — P.P. 1/4 + 1 —	60'	+	5 —	F	=	∞
(5 — S + 1 — P.P. 1/4 + 4 —	14 h.	+	5	=	F ↓ 10'	

Il s'agit donc bien d'un retard et non pas d'un arrêt définitif de la réaction.

En somme, l'antithrombine du plasma de peptone nous permet de reproduire exactement les expériences que nous avons pu réaliser avec l'hirudine. Il semble donc que le mode d'action de ces deux substances anticoagulantes soit de même nature. Selon toute vraisemblance, nous obtiendrons les mêmes résultats avec d'autres antithrombines, telles qu'on en trouve dans la tête du sclérostome, de l'anchylostome, de la tique (ixodes ricinus), dans l'hépatopancréas de l'écrevisse, etc.

L'anhydride carbonique a sur le plasma de peptone un effet coagulant tout à fait remarquable. Il était tout naturel de se demander ce qu'il adviendrait des expériences précédentes, si on les répétait avec de l'antithrombine saturée d'anhydride carbonique. Mais pour ce faire, nous ne pouvons plus employer comme source d'antithrombine du plasma de peptone normal, puisque, traité par l'anhydride carbonique, il se coagulerait. Il est indispensable de le soumettre préalablement au chauffage à 60° qui détruit le fibrinogène et le sérozyme tout en ménageant l'antithrombine. Nous obtenons ainsi une solution d'antithrombine que nous pouvons saturer d'anhydride carbonique afin d'étudier ce que devient son pouvoir anticoagulant.

EXPÉRIENCE XIII. — On divise du plasma de peptone chauffé une demi-heure à 60° en deux portions, l'une qu'on maintient telle quelle (P.P. chauffé), et l'autre qu'on sature d'anhydride carbonique (P.P. chauffé CO²). Puis à l'aide de sérum de chien riche en sérozyme (S), d'une émulsion de cytozyme lipoïdique (Cyt.) et de plasma dioxalaté (F), on fait les mélanges suivants :

(5 gouttes S + 1 goutte Cyt.)	3' + 1	+	5 gouttes F	=	↓ 1'	
(5 — S + 1 —	3' + 1 —	P.P. chauffé	+	5 gouttes F	=	∞
(5 — S + 1 —	3' + 1 —	P.P. chauffé CO ²	+	5 gouttes F	=	↓ 8'

Saturée d'anhydride carbonique, l'antithrombine perd donc en grande partie son pouvoir de neutraliser la thrombine. S'agit-il d'une altération définitive de l'antithrombine? Pour le savoir, une demi-heure après avoir saturé, à l'aide d'anhydride carbonique, le plasma de peptone chauffé, chassons l'acide par un courant d'air et répétons l'expérience.

EXPÉRIENCE XIV.

(5 gouttes S + 1 goutte Cyt.) 3' + 1 goutte P.P. chauffé + 5 gouttes F = ∞
 (5 — S + 1 — 3' + 1 — P.P. chauffé CO² + 5 — F = \downarrow 10'
 (5 — S + 1 — 3' + 1 — P.P. chauffé (CO²) + 5 — F = ∞

Avec la disparition de l'anhydride carbonique, l'antithrombine récupère tout son pouvoir anticoagulant. Elle n'avait donc subi aucune altération organique définitive. Nous retrouvons d'ailleurs le même fait à propos de l'entrave à la réaction sérozyme-cytozyme.

EXPÉRIENCE XV. — Cherchons d'abord une dose d'antithrombine qui ne neutralise plus la thrombine toute faite, mais entrave encore la réaction sérozyme-cytozyme.

(5 gouttes S + 1 goutte Cyt.) 3' + 1 goutte E. P. + 5 gouttes F = \downarrow 1'
 (5 — S + 1 — 3' + 1 g. P.P. chauffé + 5 — F = ∞
 (5 — S + 1 — 3' + 1 g. P.P. chauffé 1/2 + 5 — F = \downarrow 6'
 (5 — S + 1 g. P.P. chauffé 1/2 + 1 goutte Cyt.) 3' + 5 — F = ∞

Le plasma de peptone chauffé, dilué de moitié, répond donc aux conditions. Nous le traitons par l'anhydrique carbonique et nous constatons qu'il perd son pouvoir d'entraver la réaction.

(5 gouttes S + 1 goutte P.P. chauffé 1/2 CO² + 1 goutte Cyt.) 3' + 5 gouttes F = \downarrow 5'

Mais une demi-heure plus tard chassons l'anhydride carbonique par un courant d'air et nous voyons l'action empêchante renaître.

(5 gouttes S + 1 goutte P.P. chauffé 1/2 (CO²) + 1 goutte Cyt.) 3' + 5 gouttes F = \downarrow ∞

Ces observations sont à rapprocher d'un fait analogue que nous avions déjà pu constater antérieurement. Nous avons vu (expérience I) que du plasma de peptone filtré (P. P. F.) qui restait fluide malgré l'addition soit d'anhydride carbonique seul, soit d'un peu de cytozyme seul, se coagulait facilement par l'action simultanée de ces deux facteurs. A la suite de cette observation nous avions aussitôt institué l'expérience suivante.

EXPÉRIENCE XVI. — Un tube A contient 0 c.c. 5 de P.P. F pur + 1 goutte de cytozyme lipoidique dilué : il ne coagule pas. Un tube B contient

0 c. c. 5 de P.P.F qu'on vient de saturer d'anhydride carbonique : il ne coagule pas. Un tube C contient à la fois 0 c. c. 5 d'anhydride carbonique et une goutte de cytozyme : il coagule en 15 minutes. Deux tubes D et E contiennent chacun 0 c. c. 5 de P.P. F saturé d'anhydride carbonique ; on les bouche hermétiquement et l'on attend une demi-heure pour permettre à l'anhydride carbonique d'exercer son action éventuelle sur le plasma. Ce laps de temps écoulé, on chasse l'anhydride carbonique du tube E par un courant d'air, puis on ajoute à D et à E une goutte de cytozyme lipoïdique dilué. D coagule en 15 minutes, E ne coagule pas ; il se comporte de la même façon que A, c'est-à-dire tout à fait comme s'il n'avait jamais été traité par l'anhydrique carbonique.

L'anhydride carbonique ne cause donc pas de modification définitive du plasma ; il n'altère pas l'antithrombine. Il agit par sa simple présence au moment où le sérozyme et le cytozyme sont en conflit avec l'antithrombine. Mais il reste difficile de distinguer si ses effets coagulants proviennent de ce qu'il favorise l'union du sérozyme et du cytozyme sans affaiblir l'antithrombine, ou bien, au contraire, s'il réduit l'antithrombine à l'inpuissance sans favoriser la réaction sérozyme-cytozyme. Toutefois, étant donné que l'anhydride carbonique n'a aucune action, ni sur le plasma normal, ni sur le plasma d'oiseau, ni sur le plasma hirudiné et que son action est en somme élective pour le plasma de peptone, c'est la seconde hypothèse qui paraît la plus vraisemblable. Le plasma de peptone traité par l'anhydride carbonique se coagule tout à fait comme un plasma normal en donnant un sérum riche en thrombine et, par conséquent, privé d'antithrombine. Tout se passe, en somme, comme si l'antithrombine, sans être détruite par l'anhydride carbonique, était en quelque sorte paralysée et sortait ainsi en grande partie du jeu des réactions pour être ensuite neutralisée par la thrombine formée.

CHAPITRE VII

ACTION DE L'HIRUDINE SUR LA TRANSFORMATION DU PROSÉROZYME EN SÉROZYME

Ce qu'il importe surtout de retenir des chapitres précédents, c'est que, même à des doses sensiblement inférieures à celles requises pour neutraliser la thrombine toute faite, l'hirudine et l'antithrombine sont capables d'inhiber la réaction sérozyme-

cytozyme qui donne naissance à cette même quantité de thrombine. En d'autres termes, l'antithrombine entrave davantage la genèse de la thrombine que son action, ce qui explique du reste l'absence du fibrin-ferment dans le plasma de peptone et le plasma hirudiné. Mais en vérité, cette inhibition ne peut-elle pas intervenir de façon plus précoce encore dans le processus de la coagulation du sang ? Bordet et Delange, en effet, ont montré que le plasma n'a pas l'aptitude que possède le sérum de réagir instantanément avec le cytozyme ; il ne réagit, au contraire, que très paresseusement. Le sérozyme ne serait donc pas dans le plasma sous la même forme que dans le sérum, mais bien plutôt à l'état inactif de *prosérozyme*. Il s'ensuit que dans le processus normal de la coagulation du sang, la réaction sérozyme-cytozyme doit fatalement être précédée de la transformation préalable du prosérozyme en sérozyme actif.

En utilisant des méthodes entièrement différentes, Bordet (1) d'une part, et moi-même (2) d'autre part, avons pu constater que cette transformation est normalement soumise à trois facteurs essentiels qui sont : la présence de calcium, la présence de cytozyme et l'action du contact. Il m'a paru indispensable de compléter cette étude en voyant si l'hirudine pouvait également influencer ce stade préliminaire de la coagulation, et notamment, si des doses trop faibles pour entraver la réaction sérozyme-cytozyme et, *a fortiori*, l'action de la thrombine, ne sont pas suffisantes pour empêcher l'activation du prosérozyme. Dans ce but, nous avons repris la méthode que nous avions déjà imaginée pour rechercher les influences qui conditionnent normalement la transformation du prosérozyme en sérozyme actif, et dont voici le principe.

Nous avions pu constater, par ailleurs, que le Staphylocoque a la singulière propriété de faire coaguler du plasma oxalaté sans utiliser les agents du mécanisme normal de la coagulation que l'on retrouve intacts après la formation du caillot. Si l'on défibrine celui-ci, on obtient, en effet, non pas un sérum, mais un véritable plasma oxalaté contenant encore son cytozyme et son prosérozyme, mais plus de fibrinogène. Lorsqu'on recalculera ce « plasma de Staphylocoque », on ne pourra évidem-

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, **82**, Octobre 1919.

(2) *C. R. Soc. de Biol.*, **82**, Novembre 1919.

ment plus le faire coaguler, mais on y verra apparaître de la thrombine de façon explosive après un certain temps de latence, précisément lorsque le prosérozyme se sera transformé en sérozyme actif et sera, par conséquent, devenu apte à réagir avec le cytozyme présent ou, à plus forte raison, avec du cytozyme surajouté. Comme on peut très aisément saisir ce moment où le plasma de Staphylocoque recalcifié contient de la thrombine ou, mieux encore, est capable d'en produire instantanément par l'addition d'un peu de cytozyme, nous avons ainsi une méthode fort simple de mesurer la durée de la transformation du prosérozyme en sérozyme actif.

Nous établirons de cette façon d'abord la durée de la transformation dans du plasma de Staphylocoque normal; nous verrons ensuite ce qu'elle devient sous l'influence de minimes quantités d'hirudine.

EXPÉRIENCE XVII. — On place à 37° du plasma de lapin énergiquement centrifugé et ensemencé de Staphylocoques. On ne le retire que six heures plus tard, lorsque tout le fibrinogène est certainement coagulé, et on le défibrine. On recalcifie une prise d'essai de ce plasma de Staphylocoque à l'aide de 4 volumes d'E.P. Ca. Dès ce moment on prélève, toutes les 5 minutes, 5 gouttes de plasma de Staphylocoque recalcifié (P.S. Ca), on y ajoute 1 goutte de cytozyme (Cyt.), on attend 3', puis on verse, comme réactif de la thrombine éventuellement formée, 5 gouttes de plasma dioxalaté (F). On notera à partir de quel prélèvement le plasma de Staphylocoque, additionné de cytozyme, est capable de coaguler le plasma dioxalaté. On saura ainsi à partir de quel moment il a acquis l'aptitude de former de la thrombine en moins de 3 minutes après addition de cytozyme, c'est-à-dire à partir du moment où il contient du sérozyme actif.

DURÉE de la recalcification	
5'	(5 gouttes P.S. Ca + 1 goutte Cyt.) 3' + 5 gouttes F = ∞
30'	(5 — + 1 — 3' + 5 — F = ∞
35'	(5 — + 1 — 3' + 5 — F = $\sqrt{8'}$
40'	(5 — + 1 — 3' + 5 — F = $\sqrt{2'}$

La transformation du prosérozyme en sérozyme actif exige donc 35 minutes pour s'effectuer dans ce plasma de Staphylocoque normal. Voyons quels résultats nous obtiendrons, si nous répétons l'expérience avec le même plasma de Staphylocoque additionné d'un peu d'hirudine.

Pour cela, préparons cinq solutions d'hirudine dans l'eau physiologique (E.P.) à des titres décroissants, qui dans les conditions habituelles des expériences précédentes n'auraient plus d'effet sur la réaction sérozyme-cytozyme; par exemple, des solutions au 1/10.000, au 1/20.000; au 1/40.000, au 1/80.000 et au 1/200.000. Ensuite, dans six tubes contenant chacun 5 volumes de plasma de Staphylocoque qu'on vient de recalcifier (P.S.Ca), on verse, dans le premier, un volume d'eau physiologique, et dans chacun des cinq autres respectivement un volume d'une des solutions d'hirudine susdites. Il ne reste plus qu'à rechercher l'apparition de sérozyme actif dans chacun des mélanges, c'est-à-dire que toutes les 5 minutes on prélève 6 gouttes de chacun d'eux (P.S.Ca.H.), on y ajoute 1 goutte de cytozyme (Cyt.), on attend 3 minutes, puis on verse 5 gouttes de plasma dioxalaté (F):

(6 gouttes P.S.Ca.H. + 1 goutte Cyt.) 3' + 5 gouttes F = ? (1).

Conformément à l'essai préalable fait plus haut, on trouve du sérozyme actif 35 minutes après la recalcification dans le premier mélange qui représente le plasma normal. On n'en trouve pas dans aucun des autres. Ce n'est qu'après 70 minutes qu'on en trouve dans le sixième, c'est-à-dire celui qui contient le moins d'hirudine (H — 1/200.000), qu'après 85 minutes dans le cinquième (H — 1/80.000). Après 100 minutes, il n'y en a pas encore trace dans les autres. Ces résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous où, pour chacun des mélanges, on a marqué du signe + le moment où l'on peut y déceler la présence du sérozyme.

	25'	30'	35'	40'	45'	60'	70'	85'	100'
P.S.Ca + H 1/10.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—
P.S.Ca + H 1/20.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—
P.S.Ca + H 1/40.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—
P.S.Ca + H 1/80.000	—	—	—	—	—	—	—	+	+
P.S.Ca + H 1/200.000	—	—	—	—	—	—	+	+	+
P.S.Ca + E.P	—	—	+	+	+	+	+	+	+

Tandis qu'il faut, toutes choses égales d'ailleurs, une solution d'hirudine au 1/2.500 pour neutraliser la thrombine toute faite, une solution au 1/10.000 pour entraver la réaction sérozyme-cytozyme, il suffit d'une solution au 1/200.000 pour retarder du double la durée de la transformation du prosérozyme et sérozyme.

L'hirudine peut donc manifester ses actions antagonistes aux

(1) Il est à remarquer que pour avoir des résultats comparables on se place dans des conditions identiques à celles des expériences VI à XII: les 6 gouttes de P.S.Ca.H. contiennent en effet 1 goutte d'hirudine (H) et 5 gouttes de plasma de Staphylocoque recalcifié (P.S.Ca) lesquelles correspondent exactement aux 5 gouttes de sérum riche en sérozyme (S) des expériences précédentes. L'émulsion de cytozyme a également la concentration habituelle.

différents stades de la coagulation du sang, et d'une façon d'autant plus intense qu'on la fait intervenir plus précocement dans l'évolution du processus.

CHAPITRE VIII

DE LA SOI-DISANT NEUTRALISATION DE L'ANTITHROMBINE PAR LES LIPOÏDES

Il n'est pas, jusqu'à présent, une seule de nos expériences qui ne mette en relief l'opposition du cytozyme et de l'antithrombine.

Le cytozyme tend à s'unir au sérozyme; l'antithrombine l'en écarte. Qu'on renforce le cytozyme et l'écart diminue, qu'on renforce au contraire l'antithrombine et l'écart augmente. Il existe entre ces deux substances un véritable contre-balance-ment, chacune d'elles étant le contrepoids de l'autre. Mais le véritable soutien de cette balance, c'est le sérozyme. Supprime-t-on celui-ci, aussitôt l'antithrombine et le cytozyme lipoïdique deviennent indifférents l'un à l'autre. C'est ce dont Howell ne tient pas compte lorsque, dans sa théorie, il explique l'antagonisme des lipoïdes et de l'antithrombine par l'existence d'une soi-disant affinité chimique entre ces deux substances qui se neutraliseraient en proportions définies.

Déjà Dale et Walpole (1) n'ont pu vérifier une telle neutralisation en absence de prothrombine (sérozyme). Nous aussi, nous avons déjà montré plus haut (exp. VIII) qu'on ne parvient pas à vaincre l'antithrombine par le cytozyme lipoïdique seul, mais seulement par le concours du cytozyme et du sérozyme. Mais voici des expériences plus directes et plus objectives encore.

EXPÉRIENCE XVIII. — Dans trois tubes *a*, *b*, *c*, on verse du plasma oxalaté de lapin, qu'on vient de recalcifier à raison de 0 c.c. 25 par tube (Pl. ox. Ca). Puis on ajoute au tube *a* 2 gouttes d'eau physiologique (E. P.); au tube *b* 1 goutte d'une solution donnée d'hirudine (H) et 1 goutte d'eau physiologique; au tube *c*, 1 goutte de la même solution d'hirudine et 1 goutte d'une émulsion épaisse de cytozyme lipoïdique (Cyt.). Voici les résultats :

(1) DALE et WALPOLE. *Bioch. Journ.*, octobre 1916, **10**, n° 3, p. 356.

- a) — 0 c.c. 25 Pl. ox. Ca + 2 gouttes E.P. = 30'
 b) — 0 c.c. 25 Pl. ox. Ca + 1 goutte H + 1 goutte E.P. = ∞
 c) — 0 c.c. 25 Pl. ox. Ca + 1 goutte H + 1 goutte Cyt. = 18'

Dans cette expérience, la goutte de cytozyme lipoïdique ajoutée au plasma hirudiné du tube *c*, non seulement le fait coaguler, mais encore le fait coaguler plus rapidement que ne coagule le plasma normal du tube *a*; elle est donc plus que suffisante pour neutraliser complètement la goutte d'hirudine. C'est du moins ainsi que cela se passe dans 0 c. c. 25 de plasma normal riche en sérozyme. Si les vues de Howell sont exactes, cette neutralisation doit pouvoir s'effectuer aussi bien dans du plasma privé de sérozyme, tel que du plasma phosphaté. Or ce n'est pas du tout ce que prouve l'expérience suivante.

EXPÉRIENCE XIX. — On reproduit exactement les mêmes mélanges que dans l'expérience précédente, mais en remplaçant le plasma normal par le même plasma préalablement privé de sérozyme, grâce à l'action adsorbante du phosphate tricalcique (Pl. ox. phosph. Ca). On abandonne les trois tubes pendant 2 heures ou davantage, de façon à assurer l'union éventuelle du cytozyme et de l'hirudine. Bien entendu, pendant ce temps, aucun des trois tubes ne peut se coaguler, puisqu'aucun ne contient du sérozyme; mais on pourra en provoquer la coagulation à volonté par l'addition de thrombine toute formée. On ajoute donc, après un certain temps, 5 gouttes de thrombine (1) aux trois mélanges. Le tube *a* se coagule en 10 minutes, le tube *b* qui contient de l'hirudine reste fluide. Quant au tube *c*, qui contient la même quantité d'hirudine, mais également une quantité correspondante de cytozyme, il ne se coagule pas davantage. On répète une seconde fois l'expérience avec une dose double de thrombine: le tube *a* se coagule en 2 minutes; les tubes *b* et *c* se coagulent cette fois, mais en 8 minutes seulement et tous deux en même temps d'ailleurs.

- a) — 0 c.c. 25 Pl. ox. phosph. Ca + 2 gouttes E.P. 2 h. + 5 g. T = ↓ 10'
 b) — 0 c.c. 25 Pl. ox. phosph. Ca + 1 goutte H + 1 g. E.P. 2 h. + 5 g. T = ∞
 c) — 0 c.c. 25 Pl. ox. phosph. Ca + 1 goutte H + 1 g. Cyt. 2 h. + 5 g. T = ∞
 a') — 0 c.c. 25 Pl. ox. phosph. Ca + 2 gouttes E.P. 2 h. + 10 g. T = ↓ 2'
 b') — 0 c.c. 25 Pl. ox. phosph. Ca + 1 goutte H + 1 g. E.P. 2 h. + 10 g. T = ↓ 8'
 c') — 0 c.c. 25 Pl. ox. phosph. Ca + 1 goutte H + 1 g. Cyt. 2 h. + 10 g. T = ↓ 8'

Ces expériences montrent nettement qu'une quantité de cytozyme plus que suffisante pour neutraliser une certaine dose d'hirudine dans du plasma riche en sérozyme n'est plus du tout capable de neutraliser, ni même d'atténuer cette même dose

(1) Thrombine de Howell, voir plus loin.

d'hirudine si le plasma est privé de sérozyme. Ce n'est donc que par l'intermédiaire de celui-ci que les lipoïdes cytozymiques neutralisent l'antithrombine.

Du reste Howell considère la soi-disant neutralisation de l'antithrombine par les lipoïdes comme une réaction chimique. Or, nous venons de voir que dans 0 c.c. 25 de plasma normal riche en sérozyme, une goutte de notre émulsion de cytozyme triomphe d'une goutte de la solution d'hirudine; il devrait donc toujours en être ainsi à volume égal, quel que soit le volume. Ce n'est pas du tout ce que l'expérience démontre.

EXPÉRIENCE XX. — Si, au lieu d'une goutte d'hirudine, nous en ajoutons 2 à 0 c.c. 25 de plasma oxalaté recalcifié, il ne suffira pas de 2 gouttes de cytozyme lipoïdique pour faire coaguler celui-ci, il en faudra 4 ou 5, et encore la coagulation sera-t-elle lente. Et si c'est 3 gouttes d'hirudine qu'on a employées, le plasma restera définitivement incoagulable ou ne se coagulera qu'avec la plus extrême lenteur, quelle que soit la quantité de cytozyme qu'on ajoutera.

0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 2 gouttes E.P.	= ↓ 30'
0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 1 goutte H + 1 goutte E.P.	= ∞
0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 1 goutte H + 1 goutte Cyt.	= ↓ 18'
0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 2 gouttes H + 2 gouttes E.P.	= ∞
0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 2 gouttes H + 2 gouttes Cyt.	= ∞
0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 2 gouttes H + 3 gouttes Cyt.	= ∞
0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 2 gouttes H + 5 gouttes Cyt.	= ↓ 2 heures.

Ces faits ne peuvent s'expliquer par la théorie de Howell. Ils se comprennent très bien, au contraire, si nous admettons que la neutralisation de l'antithrombine est fonction non pas du seul cytozyme lipoïdique, mais également du sérozyme. On conçoit dès lors que si la quantité d'hirudine est trop forte, tout le sérozyme du plasma, même saturé de lipoïdes, ne suffira pas pour triompher de l'hirudine. Cette déduction se vérifie d'ailleurs très facilement.

EXPÉRIENCE XXI. — Un tube contenant 0 c.c. 25 de plasma oxalaté recalcifié, 2 gouttes d'hirudine et 5 gouttes de cytozyme est encore fluide après une heure. Il suffit d'y ajouter 0 c.c. 25 de sérum riche en sérozyme (S) pour en provoquer la coagulation en moins de 5 minutes, alors qu'ajouté de 0 c.c. 25 d'eau physiologique, il ne se coagulait péniblement qu'en 2 heures.
 (0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 2 gouttes H + 5 gouttes Cyt.) 60' + 0,25 S = ↓ 4'
 (0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 2 gouttes H + 5 gouttes Cyt.) 60' + 0,25 E.P. = ↓ 2 h.

Dans ce cas-ci, on serait donc tout aussi autorisé à dire que c'est le sérozyme qui neutralise l'antithrombine.

Ces observations, et d'autres encore qu'il nous paraît superflu de décrire, et dans lesquelles on ne peut pas davantage mettre en évidence la soi-disant affinité de l'antithrombine et des lipoïdes, nous confirment dans l'opinion que c'est au contraire en satisfaisant son affinité pour le sérozyme, conformément à la théorie de Bordet et Delange, que le cytozyme lipoïdique parvient à vaincre la résistance de l'antithrombine.

CHAPITRE IX

LA NEUTRALISATION RÉCIPROQUE DE LA THROMBINE ET DE L'ANTITHROMBINE

Nous venons de démontrer que les lipoïdes n'ont aucune aptitude à se combiner avec l'antithrombine. Celle-ci ne peut être réellement neutralisée que par la thrombine résultant de l'union d'une quantité suffisante de sérozyme avec une quantité convenable de lipoïdes cytozymiques.

On sait, en effet, depuis Morawitz, que la thrombine neutralise quantitativement l'antithrombine. Nous nous proposons d'étudier cette réaction et le complexe qu'elle produit. Mais avant cela, disons un mot des substances en jeu, ou plutôt ne parlons plus ici que de la thrombine, puisqu'aussi bien nous avons traité de l'antithrombine et de l'hirudine dans des chapitres précédents.

La thrombine.

Nous avons suffisamment discuté la genèse de la thrombine pour ne plus devoir y revenir; mais voyons sous quelles formes cet agent peut se présenter et quelle est celle qui convient le mieux pour l'expérimentation.

Nous savons qu'on retrouve la thrombine en plus ou moins grande quantité dans le sérum après la coagulation. C'est évidemment une source qu'on peut utiliser; mais, pour des expériences un peu précises, son emploi est à rejeter, car la richesse des sérums en thrombine est très variable et, de plus, comme cet agent est très labile dans le sérum, son activité faiblit trop rapidement pour donner des résultats comparables.

Il est préférable de recourir à la production extemporanée de thrombine fraîche par la réaction de Bordet et Delange. En mélangeant, dans des conditions toujours identiques, une quantité donnée de sérum riche en sérozyme avec une quantité donnée de cytozyme lipoïdique, on obtient, au bout de trois minutes, une quantité constante de thrombine très active qu'on emploiera instantanément. Comme cette réaction est très rapide et qu'on peut la répéter dans un très grand nombre de tubes à la fois, et à n'importe quel moment, on a ainsi sous la main, quand on le désire, une source de thrombine très pratique et suffisamment constante pour bien des expériences. Nous y avons eu très souvent recours, notamment dans la plupart des expériences précédentes où cette méthode était même obligée.

Une thrombine tout à fait recommandable, en raison de sa stabilité et de son emploi fort pratique, est celle que l'on obtient, à l'instar de Gamgee, en faisant digérer pendant deux ou trois jours, dans une solution de NaCl à 8 pour 100, de la fibrine de porc fraîche et bien lavée. Le liquide visqueux qu'on obtient, filtré, puis dilué de 9 volumes d'eau distillée, donne une solution isotonique de thrombine très active et tout à fait stable. Howell a très ingénieusement perfectionné la méthode en précipitant la thrombine de la solution concentrée et filtrée, à l'aide d'un égal volume d'acétone. Le précipité jaunâtre qu'on obtient est aussitôt étalé, aussi finement que possible, sur du papier filtre et séché dans un courant d'air. La thrombine se conserve ainsi fort bien, à l'état sec. Au moment de s'en servir, il suffit de découper un fragment de ce papier filtre et de le laisser macérer pendant une heure ou deux dans un peu d'eau physiologique pour obtenir une solution active très limpide et que Howell considère, mais à tort, comme une solution pure de thrombine. Ainsi que le montre l'expérience suivante, il est facile de constater que la thrombine de Howell n'est pas pure, mais est au contraire riche en cytozyme.

EXPÉRIENCE XXII. — On prépare du plasma dioxyalaté de lapin (F), du sérum riche en sérozyme de lapin (S), de la thrombine de Howell (T), de la thrombine de Howell chauffée à 60° (T chauffée), et l'on fait les mélanges suivants dont on note les temps de coagulation.

$$a) 0 \text{ c.c. } 5 \text{ T} + 0 \text{ c.c. } 5 \text{ E.P.} + 1 \text{ c.c. } F = \downarrow 6'$$

$$b) 0 \text{ c.c. } 5 \text{ T chauffée} + 0 \text{ c.c. } 5 \text{ E.P.} + 1 \text{ c.c. } F = \infty$$

$$c) 0 \text{ c.c. } 5 \text{ T chauffée} + 0 \text{ c.c. } 5 \text{ S} + 1 \text{ c.c. } F = \downarrow 10$$

Chauffée à 60°, la thrombine de Howell perd son activité (*b*), mais elle conserve son cytozyme, qui est capable de réagir avec le sérozyme du sérum pour donner de la nouvelle thrombine (*c*).

La thrombine de Howell est donc cytozymique et cela se conçoit aisément, puisque la fibrine dont elle provient a entraîné dans ses mailles, au moment de la coagulation, toutes les plaquettes du sang.

La thrombine normale du sérum est au contraire, comme nous le savons, sérozymique, car la coagulation se produisant avant que tout le sérozyme n'ait été consommé, ce qui reste de celui-ci se retrouve dans le sérum. Quant à la thrombine obtenue par la réaction de Bordet et Delange, elle sera sérozymique ou cytozymique, selon que la quantité de cytozyme qu'on aura employée dans la réaction n'aura pas atteint, ou aura au contraire, dépassé la limite de saturation du sérozyme. Comme on en ajoute généralement une assez grande quantité, c'est le second cas qui est la règle.

Aucune des thrombines que l'on peut employer n'est donc strictement pure. C'est une notion dont il faut toujours tenir compte au cours des expériences, pour savoir éviter des causes d'erreur et interpréter les résultats à leur juste valeur.

C'est un fait que la thrombine n'a pas besoin de sels calciques solubles pour coaguler le fibrinogène. On peut cependant se rendre compte par l'expérience suivante qu'elle perd sensiblement de son activité lorsqu'on l'oxalate.

EXPÉRIENCE XXIII. — On filtre une macération de fibrine de porc et on divise en deux portions le liquide visqueux et fortement hypertonique que l'on obtient. L'on dilue l'une de ces portions à l'aide de 9 volumes d'eau distillée pure, et l'autre à l'aide de 9 volumes d'eau distillée oxalatée à 1 p. 1.000. Il se produit dans cette dernière un précipité d'oxalate calcique qu'on laisse se déposer. On possède ainsi deux solutions de thrombine dont l'une est encore calcifiée (T) et dont l'autre est oxalatée (T ox.). Ayant, d'autre part, préparé du plasma dioxalaté de lapin (F), on fait les mélanges suivants, dont on note les temps de coagulation :

$$a) 0 \text{ c. c. } 5 \text{ T} + 0 \text{ c. c. } 5 \text{ F} = \downarrow 2'$$

$$b) 0 \text{ c. c. } 5 \text{ T. ox.} + 0 \text{ c. c. } 5 \text{ F} = \downarrow 10'$$

Il existe donc une différence notable dans l'activité de la thrombine, selon qu'elle est calcifiée ou oxalatée. Il y a lieu de rappeler, à ce sujet, que Bordet et Delange ont déjà décrit sous le nom d'oxalatation séparée un phénomène fort semblable,

qu'ils avaient réalisé avec de la thrombine issue d'un mélange de sérozyme et de cytozyme.

* * *

Ces renseignements préliminaires étant établis, revenons-en au véritable objet de nos recherches, à savoir la nature de la neutralisation réciproque de la thrombine et de l'antithrombine.

Existe-t-il réellement entre ces deux substances une affinité, capable de les entraîner dans une combinaison inactive ?

Voyons ce que répond l'expérience.

EXPÉRIENCE XXIV. — (Pour la technique, voir Expériences V et VI.) Recherchons une dose d'hirudine capable d'entraver nettement une réaction sérozyme-cytozyme.

$$\begin{array}{llllll} (5 \text{ gouttes S} + 1 \text{ goutte E.P.} & + 1 \text{ goutte Cyt.}) 3' + 5 \text{ gouttes F} & = \downarrow 1' \\ (5 \text{ —} & \text{S} + 1 \text{ —} & \text{H 1/2.800} + 1 \text{ —} & 3' + 5 \text{ —} & \text{F} = \infty \\ (10 \text{ —} & \text{S} + 1 \text{ —} & \text{H 1/2.800} + 2 \text{ —} & 3' + 5 \text{ —} & \text{F} = \infty \end{array}$$

En conséquence, 1 goutte d'une solution d'hirudine au 1/2.800 répond bien à nos désirs. Nous neutralisons cette quantité d'hirudine par une quantité convenable de thrombine toute faite, telle que le mélange puisse faire coaguler du fibrinogène.

$$[(5 \text{ gouttes S} + 1 \text{ goutte Cyt.}) 3' + 1 \text{ goutte H 1/2.800}] + 5 \text{ gouttes F} = \downarrow 10'$$

Mais la thrombine est labile, tandis que l'hirudine est stable. Si on laisse donc vieillir un semblable mélange, l'hirudine soi-disant neutralisée par le fibrin-ferment ne va-t-elle pas se démasquer et redevenir active au fur et à mesure que la thrombine disparaîtra ? Il n'en est rien. L'hirudine neutralisée reste neutralisée, même après la mort du fibrin-ferment.

Pour nous en assurer répétons, dans trois tubes *a*, *b*, *c*, le mélange d'hirudine (H) et de thrombine (5 gouttes S + 1 goutte Cyt.) dans lequel l'hirudine est amplement neutralisée par un excès de thrombine :

$$[(5 \text{ gouttes S} + 1 \text{ goutte Cyt.}) 3' + 1 \text{ goutte H 1/2.800}] = 7 \text{ gouttes (T} > \text{H)}$$

et laissons vieillir 24 heures.

Après ce laps de temps, la thrombine du mélange T > H a complètement disparu :

$$a) 7 \text{ gouttes (T} > \text{H}) + 5 \text{ gouttes F} = \infty.$$

Pourtant l'hirudine ne s'est pas démasquée, car le mélange T > H n'a pas récupéré la propriété d'entraver la réaction sérozyme-cytozyme.

$$b) (5 \text{ gouttes S} + 7 \text{ gouttes (T} > \text{H}) + 1 \text{ goutte Cyt.}) 3' + 5 \text{ gouttes F} = \downarrow 5'.$$

L'hirudine du mélange n'est pourtant pas détruite, car ce que le vieillissement n'a pu faire, le chauffage à 60° peut le réaliser.

Chauffé à 60° le mélange T < H restitue son hirudine : il redevient capable d'entraver la réaction sérozyme-cytozyme.

c) (5 gouttes S + 7 gouttes (T < II) chauffé 60° + 1 goutte Cyt.) 3' + 5 g.F = ∞.

Nous observons des faits identiques, en ce qui concerne la neutralisation de l'antithrombine du plasma de peptone.

EXPÉRIENCE XXV. — On commence par vérifier qu'un échantillon de plasma de peptone (P.P.) contient assez d'antithrombine pour empêcher la coagulation d'un égal volume de plasma normal oxalaté recalcifié.

$$\begin{aligned} 0 \text{ c.c. } 5 \text{ E.P.} + 0 \text{ c.c. } 5 \text{ Pl. ox.} + 0 \text{ c.c. } 2 \text{ E.P.Ca.} &= \downarrow 23' \\ 0 \text{ c.c. } 5 \text{ P.P.} + 0 \text{ c.c. } 5 \text{ Pl. ox.} + 0 \text{ c.c. } 2 \text{ E.P.Ca.} &= \infty. \end{aligned}$$

En saturant d'anhydride carbonique ce plasma de peptone, on le fait coaguler en 10 minutes. On le désébire aussitôt et récolte un sérum (S.P.P.), dont l'antithrombine est complètement neutralisée par l'excès de thrombine qui s'est formée. Ce sérum frais est, en effet, capable de faire coaguler du plasma dioxalaté normal (F) :

$$0 \text{ c.c. } 5 \text{ S.P.P.} + 0 \text{ c.c. } 5 \text{ F} = \downarrow 42'.$$

On laisse vieillir le sérum pendant 24 heures, après quoi on vérifie que la thrombine a complètement disparu :

$$0 \text{ c.c. } 5 \text{ S.P.P.} + 0 \text{ c.c. } 5 \text{ F} = \infty.$$

Malgré cela, l'antithrombine neutralisée ne s'est pas libérée, puisque le sérum vieux n'a pas récupéré la propriété d'empêcher la coagulation d'un égal volume d'un plasma normal :

$$\begin{aligned} 0 \text{ c.c. } 5 \text{ E.P.} + 0 \text{ c.c. } 5 \text{ Pl. ox.} + 2 \text{ c.c. E.P.Ca.} &= \downarrow 38' \\ 0 \text{ c.c. } 5 \text{ S.P.P.} + 0 \text{ c.c. } 5 \text{ Pl. ox.} + 2 \text{ c.c. E.P.Ca.} &= \downarrow 30' \end{aligned}$$

Mais, chauffé à 60°, le sérum restitue l'antithrombine et redevient capable d'exercer une action anticoagulante :

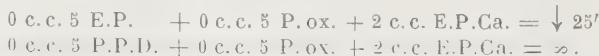
$$\begin{aligned} 0 \text{ c.c. } 5 \text{ E.P.} + 0 \text{ c.c. } 5 \text{ Pl. ox.} + 2 \text{ c.c. } 2 \text{ E.P.Ca.} &= \downarrow 40' \\ 0 \text{ c.c. } 5 \text{ S.P.P. chauffé } 60^\circ + 0 \text{ c.c. } 5 \text{ Pl. ox.} + 2 \text{ c.c. } 2 \text{ E.P.Ca.} &= \infty. \end{aligned}$$

Entre la thrombine et l'antithrombine, il se forme donc un complexe inactif qui résiste au vieillissement, mais se désagrège par le chauffage à 60°.

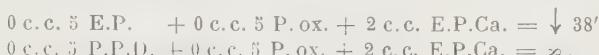
La thrombine a donc de l'affinité à la fois pour le fibrinogène et pour l'antithrombine. Qu'advient-il, lorsque ces substances se trouvent toutes trois en présence dans le même milieu? La thrombine, pour pouvoir coaguler le fibrinogène, devra-t-elle d'abord avoir complètement neutralisé l'antithrombine, ou bien pourra-t-elle se répartir sur les deux substances simultanément et coaguler une partie du fibrinogène, tout en neutralisant partiellement l'antithrombine? Les expériences suivantes nous donneront la réponse.

EXPÉRIENCE XXVI. — Un plasma de peptone faible donne spontanément, après 36 heures, un caillot très mou. Dans ce cas, évidemment, la coagulation

du fibrinogène s'est opérée dans un mélange de thrombine et d'antithrombine. Or, si l'on défibrine le caillot, l'on constate que le plasma défibriné (P.P.D.) contient encore de l'antithrombine, puisqu'il peut empêcher la coagulation d'un égal volume de plasma normal oxalaté (P. ox.) qu'on a recalcifié.



EXPÉRIENCE XXVII. — On ajoute 2 volumes d'eau distillée à 1 volume de plasma de peptone fort. La coagulation débute 4 heures plus tard et finit par donner un caillot assez ferme. On défibrine et, comme dans l'expérience précédente, on constate que le plasma de peptone défibriné (P.P.D.) contient encore de l'antithrombine (1).



Lorsque de la thrombine se forme à la longue dans le plasma de peptone, malgré la résistance de l'antithrombine, elle se trouve partagée entre deux sollicitations du fait de son affinité pour le fibrinogène d'une part, et pour l'antithrombine de l'autre. Au lieu que l'une de ces affinités l'emporte totalement sur l'autre, il va se faire un partage des affinités, et l'on verra la thrombine coaguler une plus ou moins grande quantité de fibrinogène avant d'avoir complètement neutralisé l'antithrombine.

Certaines influences, telle que la concentration saline ou la réaction du milieu, peuvent conditionner ce partage d'affinités en favorisant l'une d'elles au détriment de l'autre. C'est ainsi que l'eau distillée, les acides, l'anhydride carbonique, tendant à dissocier la combinaison thrombine-antithrombine en faveur de la combinaison thrombine-fibrinogène, sont capables d'accélérer considérablement la coagulation du plasma de peptone.

Si, au lieu de mettre en présence à la fois la thrombine, le fibrinogène et l'antithrombine, on mélange d'abord la thrombine et le fibrinogène, ils se combinent rapidement pour donner de la fibrine et l'addition subséquente d'antithrombine ne peut plus dissocier la combinaison. Inversement, lorsqu'on ajoute du fibrinogène à un mélange tout récent de thrombine et d'antithrombine, le fibrinogène peut encore parfois soustraire un

(1) Il n'en est cependant pas toujours ainsi. Lorsque le plasma de peptone coagule rapidement, sous l'influence d'anhydride carbonique par exemple, il y a alors production d'une grande quantité de thrombine qui neutralise complètement l'antithrombine.

peu de thrombine à la combinaison et se coaguler; mais si le complexe est vieux, le fibrinogène qu'on ajoute ne peut plus le dissocier et ne coagulera pas. Tous ces faits reproduisent fidèlement ce que nous connaissons sur les combinaisons capables de se réaliser entre une toxine, son antitoxine et la cellule pour laquelle la toxine a également de l'affinité. Lorsqu'une toxine s'est fixée sur les cellules pour lesquelles elle a une affinité spécifique (toxine tétanique et cellule nerveuse, ricine et globules rouges), la combinaison est trop stable pour que l'addition subséquente d'antitoxine puisse réparer le mal. Inversement, lorsqu'un complexe toxine-antitoxine s'est stabilisé, les cellules toxophyles qu'on y ajoute ne peuvent plus le dissocier pour fixer la toxine. Toutefois, si le complexe est encore récent, il est des cas où la dissociation peut encore se produire lorsqu'on ajoute, par exemple, ainsi que Madsen l'a constaté, des globules rouges à un mélange neutre et récent de ricine et d'antiricine. On voit alors que les globules rouges peuvent encore fixer de la ricine et remettre de l'antiricine en liberté. Or, chose curieuse, et qui met tout particulièrement en relief l'analogie de ces phénomènes avec ceux de la coagulation du sang, la dissociation des complexes toxine-antitoxine, et c'est notamment le cas pour la toxine tétanique et son anticorps, peut être provoquée par l'addition d'acides ou par la dilution. En somme, qu'il s'agisse d'une toxine ou de thrombine, ces phénomènes sont comparables. Lorsqu'on fait un mélange de toxine (ricine, thrombine) avec son antitoxine (antiricine, anti-thrombine) en présence d'une troisième substance pour laquelle la toxine possède également de l'affinité (globules rouges, fibrinogène), il se fait entre cette troisième substance et l'antitoxine une lutte d'affinités; il s'établit une concurrence pour la possession de la toxine. Et, selon les quantités relatives des substances en réaction et les conditions de milieu qui règlent le jeu des affinités en favorisant les unes aux dépens des autres, il pourra se produire une infinité de combinaisons variables dans un sens ou dans l'autre. Le résultat de ces réactions sera une intoxication plus ou moins forte ou nulle s'il s'agit de toxine, une coagulation plus ou moins rapide ou, au contraire, le maintien de la fluidité s'il s'agit de thrombine.

RÉSUMÉ

Il existe un certain nombre de substances anticoagulantes qu'on réunit sous le terme général d'*antithrombines* parce qu'elles ont la propriété de neutraliser plus ou moins quantitativement la thrombine. Les deux types principaux de ces substances sont l'extrait des têtes de sanguines ou hirudine et l'antithrombine du plasma de peptone.

1^o En vérité, si les antithrombines préservent le sang de la coagulation, ce n'est pas en neutralisant la thrombine qui s'y formerait éventuellement, mais bien plutôt en paralysant la production de cet agent. Nous avons réussi, en effet, à montrer que les antithrombines exercent leur action inhibitrice aux différents temps de la coagulation et d'une façon d'autant plus intense qu'on les fait intervenir plus précocement dans l'évolution du processus. S'il faut, par exemple, toutes choses égales d'ailleurs, une solution d'hirudine au 1/2.500^e pour neutraliser une quantité donnée de thrombine, il suffira d'une solution au 1/10.000^e pour entraver la réaction sérozyme-cytozyme qui donne naissance à cette même quantité de thrombine, et une solution au 1/200.000^e seulement pour inhiber la transformation du prosérozyme en sérozyme actif. Ainsi s'explique pourquoi le plasma de peptone et le plasma hirudiné ne contiennent pas de thrombine.

2^o La neutralisation réciproque de la thrombine et de l'antithrombine donne lieu à la formation de complexes qui résistent au vieillissement, mais que le chauffage à 60° désagrège en remettant l'antithrombine en liberté. La combinaison thrombine-antithrombine se prête, d'autre part, à diverses observations fort comparables à celles relatives au mode d'union des antigènes et des anticorps.

Lorsque l'union de la thrombine et de l'antithrombine doit se faire en présence de fibrinogène pour lequel la thrombine a également de l'affinité, il se produit un partage des affinités et la thrombine fait coaguler une plus ou moins grande quantité de fibrinogène, alors qu'elle n'a pas encore complètement neutralisé l'antithrombine.

En somme, il semble bien que l'antithrombine s'oppose à l'action de la thrombine sur le fibrinogène, parce qu'en raison de son affinité pour la thrombine, elle tend à se substituer au fibrinogène.

3^o Bien que les résultats précédents s'obtiennent aussi bien avec l'antithrombine de plasma de peptone qu'avec l'hirudine, on ne peut en aucune façon identifier ces deux substances. Il existe de trop grandes différences entre les propriétés du plasma de peptone et celles du plasma hirudiné. Tandis que le premier se coagule par l'addition d'agents thromboplastiques tels que l'eau distillée, les acides, un courant d'anhydride carbonique, etc., le second reste parfaitement indifférent à leurs actions. Certains auteurs (Dastre et Floresco, Mellanby) ont même été jusqu'à nier l'existence de l'antithrombine du plasma de peptone, qu'ils considèrent simplement comme un excès d'alcali déversé par le foie dans la circulation lors du choc propeptonique. Mais je n'ai pu confirmer une telle opinion — par ailleurs déjà fort critiquée — car, même en employant la méthode colorimétrique fort délicate de Mac Mariott, je n'ai pu déceler la moindre différence d'alcalinité entre le plasma de peptone et le plasma normal.

4^o Les lipoïdes ont la propriété de faire coaguler le plasma de peptone et le plasma hirudiné. Ce fait, observé pour la première fois par Wooldridge, s'explique de façon totalement différente selon la théorie générale de la coagulation que l'on adopte.

Nos recherches sur cette question nous ont amené à confirmer l'opinion de Bordet et de Delange, selon laquelle les lipoïdes (cytozyme) s'uniraient, en présence de calcium, avec le sérozyme pour donner de la thrombine et entreraient donc dans la constitution même de cet agent. C'est, par conséquent, en tant que générateurs de thrombine que les lipoïdes font coaguler le plasma de peptone et le plasma hirudiné.

Nous ne pouvons nous rallier à la façon de voir de Nolf, selon laquelle les lipoïdes seraient de simples agents thromboplastiques et feraient coaguler le plasma de peptone de la même manière que l'eau distillée, l'anhydride carbonique ou les précipités colloïdaux. La similitude des effets exercés par les lipoïdes et par les agents thromboplastiques ne donne que l'illusion d'une similitude d'action. Rappelons, en effet, que les

lipoïdes ajoutés à du sérum riche en sérozyme y font naître, à l'égal des leucocytes, des plaquettes ou des sucs de tissus, une grande quantité de thrombine nouvelle, ce qu'aucun agent thromboplastique ne peut réaliser. Nous avons pu démontrer de plus que les agents thromboplastiques, facteurs favorisants de la coagulation, ne peuvent agir qu'au prorata de la teneur du plasma en lipoïdes cytozymiques, facteurs déterminants du phénomène.

Nous ne pouvons pas non plus accepter l'opinion de Howell, d'après laquelle les lipoïdes neutraliseraient l'antithrombine en raison d'une soi-disant affinité chimique existant entre ces deux substances.

Jamais, en effet, nous n'avons pu observer la neutralisation, ni même l'atténuation de l'antithrombine par les lipoïdes seuls, mais seulement par l'action combinée des lipoïdes et du sérozyme, ce qui nous confirme dans l'opinion que c'est, au contraire, en satisfaisant son affinité pour le sérozyme que le cytozyme lipoïdique triomphe de la résistance de l'antithrombine.

Au cours de nos recherches, nous avons pu encore observer un certain nombre de faits particuliers :

5^o L'antithrombine du plasma de peptone est partiellement adsorbable par de grandes quantités de phosphate tricalcique.

6^o L'antithrombine du plasma de peptone est fortement atténuée par un courant d'anhydride carbonique; il ne s'agit pas d'une altération de l'antithrombine, car celle-ci récupère son activité dès qu'on chasse l'anhydride carbonique par un courant d'air.

7^o La thrombine obtenue par la macération de fibrine dans une solution salée hypertonique (thrombine de Gamgee et thrombine de Howell) n'est pas pure. Elle contient du cytozyme.

8^o La thrombine peut agir en milieu décalcifié, mais elle perd néanmoins beaucoup de son activité quand on l'oxalate.

Je ne puis terminer ce mémoire sans exprimer ici ma vive gratitude à M. le professeur Bordet qui, au cours de mes recherches, n'a cessé de me prodiguer ses conseils éclairés et ses encouragements.

L'ISOLEMENT DES BACILLES DE KOCH A PARTIR DES CRACHATS TUBERCULEUX D'APRÈS LA MÉTHODE DE PÉTROF

par HENRI LIMOUSIN.

En 1915, S. A. Péetrof, chef du laboratoire de recherches du sanatorium Trudeau, à Saranac Lake (New-York), a publié dans le *Johns Hopkins Hospital Bulletin* une méthode très pratique pour isoler les bacilles de Koch des crachats tuberculeux par ensemencement sur milieu d'isolement, sans passer par l'animal.

Au cours d'un récent voyage aux Etats-Unis, nous avons eu l'heureuse occasion de travailler au laboratoire du sanatorium Trudeau où Péetrof a bien voulu nous montrer sa technique. Nous avons tout récemment étudié et appliqué celle-ci au laboratoire de M. le professeur Calmette à l'Institut Pasteur, et nous croyons être utile aux bactériologistes en la décrivant.

Nous avons opéré sur des crachats recueillis à l'hôpital Laënnec, dans le service du professeur Léon Bernard. Le principe de la méthode consiste d'abord à traiter les crachats, à l'étuve à 37°, par une solution de soude caustique pour les liquéfier et tuer la plus grande partie des germes, le bacille de Koch n'étant pas détruit par l'alcali; puis à ensemencer le culot de centrifugation de ce mélange sur un milieu spécial : œuf, peptone et violet de gentiane (cette matière colorante a pour but d'empêcher le développement des germes, autres que le bacille de Koch, qui n'auraient pas été détruits par la soude).

Technique.

Les crachats sont recueillis dans un flacon stérile à large goulot, pourvu d'un bon bouchon de caoutchouc. Pour les crachats fluides, peu purulents, on emploie parties égales de crachat et de solution stérile de NaOH (à l'alcool) à 4 p. 100 dans l'eau distillée. Si les crachats sont épais, très purulents, on

augmente la proportion de solution de soude jusqu'à trois et quatre fois le volume du crachat. On agite vigoureusement et on porte à l'étuve à 37° pendant trente minutes. On agite à nouveau et on reporte encore trente minutes à l'étuve. On centrifuge pendant un quart d'heure, puis on enlève le liquide surnageant de façon à n'en laisser que deux ou trois gouttes au-dessus du culot. Si l'opération a été bien conduite, le sédiment ne doit pas avoir de consistance glaireuse et doit être exempt de grumeaux. On ajoute quatre à cinq gouttes d'HCl à 4 p. 100. On vérifie la réaction acide au tournesol et on aspire à la pipette le sédiment émulsionné par agitation dans le liquide surnageant. Il ne reste plus qu'à ensemencer celui-ci sur cinq tubes du milieu spécial coloré, en versant à la surface de chaque tube trois à quatre gouttes de l'émulsion. On recherche par la même occasion la présence de bacilles de Koch dans le crachat en déposant une goutte de l'émulsion sur une lame lavée préalablement à l'acide chlorhydrique. Cette dernière manœuvre a pour but de faire adhérer à la lame le sédiment qui se fixe très mal sur le verre ordinaire. On colore ensuite par la technique de Ziehl-Nielsen.

Préparation du milieu de Pétröf.

Prendre 250 grammes de veau frais écrasé au hachoir stérile;

Ajouter 212 grammes d'eau distillée,

Et 37 gr. 5 de glycérine stérile.

Placer le tout à la glacière pendant une nuit, puis filtrer sur gaze stérile.

Prendre d'autre part des œufs frais (16 à 20), désinfecter la coquille par immersion quinze minutes dans l'alcool à 70°. Les casser en les manipulant avec des gants de caoutchouc stérilisés.

Mélanger intimement blanc et jaune, puis filtrer sur gaze stérile.

Mélanger : 200 cent. cubes de filtrat de viande avec
400 cent. cubes de filtrat d'œuf.

Ajouter, pour 100 cent. cubes de ce mélange, 1 cent. cube de la solution suivante :

Violet de gentiane.	0 gr. 5
Alcool à 93°	50 cent. cubes.

Bien mélanger, puis répartir en tubes.

Coaguler, comme pour le sérum, à l'étuve à :

85°	pendant	30	minutes	le premier jour;
75°	—	30	—	le deuxième jour;
75°	—	30	—	le troisième jour.

Les ustensiles employés doivent tous être stériles.

Le milieu obtenu présente une belle coloration violette homogène qui permet d'observer facilement l'apparition des colonies qui poussent au jaune.

Pétrof utilise ce même milieu sans violet pour les repiquages ultérieurs après isolement des bacilles.

Résultats.

Tous les échantillons de crachats contenant des bacilles de Koch après le traitement à la soude nous ont donné d'emblée une culture pure de bacilles tuberculeux. Il arrive que, dans quelques tubes, on observe les premiers jours de rares colonies d'impuretés qui ne parviennent pas à envahir le milieu. Il s'agit presque toujours d'un coccus rouge brique ou d'un lepto-thrix (obtenu une seule fois) qui liquéfie totalement le milieu.

Il est essentiel de n'ensemencer qu'un sédiment bien débarrassé de mucus. En pratique, cette méthode nous a toujours permis d'obtenir au moins deux tubes de culture de bacille de Koch pur sur cinq ensemencés.

Lorsque le sédiment est très riche en bacilles, ceux-ci poussent en douze à quatorze jours, formant un voile presque continu, farineux, sec, recouvrant toute la surface où a coulé l'émulsion. Lorsque le sédiment est très pauvre, la culture pousse beaucoup plus lentement; les colonies apparaissent alors isolées, peu nombreuses et très petites.

(Laboratoire de M. le professeur Calmette.)

Le Gérant : G. MASSON.